

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

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

María Jesús Palomo Peiró-septiembre 1995

CAPÍTULO 4

**EFECTO DEL LAVADO Y SELECCIÓN
DE ESPERMATOZOIDES SOBRE LA FIV**

INTRODUCCIÓN

El lavado de espermatozoides consiste en la separación de los espermatozoides del plasma seminal y su reconstitución en un medio de cultivo. El lavado es realizado normalmente como un proceso preliminar en la mayoría de estudios morfológicos y bioquímicos, así como en la preparación de los espermatozoides para la inseminación artificial, selección de sexo o FIV. También es necesario para eliminar los crioprotectores y conservantes cuando se utiliza semen congelado.

Numerosos son los estudios realizados sobre los efectos del plasma seminal en los espermatozoides eyaculados, pero todavía en la actualidad permanecen discutibles. Ciertos autores sugieren que el plasma seminal es importante para el mantenimiento de la motilidad, otros indican que tiene poco efecto e incluso algunos han indicado efectos perjudiciales del plasma en la viabilidad de los espermatozoides (Graham, 1994). Sin embargo, la mayoría de estos estudios se han centrado principalmente en la evaluación de su efecto en el proceso de crioconservación de los espermatozoides, y muy pocos en los sistemas de FIV. No obstante, los espermatozoides parecen desprenderse de todo el plasma seminal antes de llegar al lugar de fecundación *in vivo*, independientemente de donde se deposite el semen durante el coito (revisado por Hafez, 1989). Además, ha sido demostrado que este fluido masculino contiene sustancias estabilizadoras de la membrana del espermatozoide que impiden la capacitación y reacción acrosómica (revisado por First y Parrish, 1987; Fournier-Delpech y Thibault, 1991; Crozet, 1991a). Oliphant y Brackett (1973) observaron que el lavado de los espermatozoides, previo a la incubación, aceleraba la capacitación *in vitro*, probablemente por eliminación de estos componentes inhibitorios de la superficie del espermatozoide (Brackett y Oliphant, 1975).

El lavado del semen mediante la sedimentación por centrifugación de los espermatozoides y su resuspensión en un nuevo medio, es considerado como el método más rápido y eficaz para la eliminación de materiales indeseados (revisado por Gordon, 1994). No obstante, existen evidencias, especialmente en semen humano, que demuestran que la sedimentación de una población de espermatozoides por centrifugación puede causar la producción de componentes oxígeno reactivos (radicales superóxidos e hidroxilos) en el sedimento, lo que provocaría un daño irreversible en los espermatozoides, perjudicando así su capacidad de fecundación *in vitro* (Aitken y Clarkson, 1988). Este daño subletal se caracteriza por la manifestación retrasada de sus efectos, normalmente disminuyendo la motilidad a lo largo del tiempo (Alvarez y col., 1993). También en especies domésticas, el lavado de los espermatozoides ha sido asociado con el daño celular (Harrison y White, 1972, Jones y Holt, 1974), por lo que diferentes sistemas de lavado de espermatozoides han sido desarrollados para reducir el efecto perjudicial de la centrifugación. Entre estos métodos se encuentran aquellos que implican también un proceso de centrifugación pero a través de un medio de alta densidad como la utilización de una solución de Ficoll (Harrison, 1976) que permita eliminar más eficazmente el medio original de los espermatozoides con un mínimo de daño mecánico.

La motilidad de los espermatozoides es esencial para su transporte a lo largo del tracto genital femenino, así como para la fecundación *in vivo* de los ovocitos. También en los sistemas de FIV ha sido sugerido, especialmente en la especie humana, que la motilidad espermática es un factor importante en la tasa de fecundación (Mahadevan y Trounson, 1984; Gellert-Mortimer y col., 1988). Por esta razón, varias metodologías han sido desarrolladas no sólo

para conseguir la separación del plasma seminal o de otros componentes, sino también para seleccionar los espermatozoides más móviles y viables de una muestra de semen, de especial importancia en semen congelado y en ciertos casos de infertilidad masculina. Entre los métodos para seleccionar los espermatozoides más móviles, el *swim-up* (Parrish y col., 1985a,b; Berger y col., 1985) ha sido el método más comúnmente empleado en los laboratorios de FIV (Ng y col., 1992), basándose en la habilidad de los espermatozoides de nadar hacia arriba en un medio.

Durante la pasada década, muchos grupos de investigación dedicados al estudio de la infertilidad en la especie humana han demostrado que los espermatozoides lavados en un gradiente de Percoll mejoraban su motilidad y capacidad de fecundación *in vitro* (Guerin y col. 1989; Akerlof y col., 1987; Hyne y col., 1986), incluso más eficazmente que con el *swim-up*. Este método del Percoll separa las poblaciones de espermatozoides de acuerdo a su densidad (Bolton y Braude, 1984), recogiendo los espermatozoides con un núcleo denso y homogéneo principalmente en la fracción de mayor densidad del gradiente Percoll. También en las especies domésticas, algunos autores han utilizado gradientes de Percoll en los sistemas de FIV (bovino: Utsumi y col., 1991; Van Soom et al., 1992; Mermillod y col., 1992; Keefer y Paprocki, 1995; cerdo: Grant y col., 1994; morueco: Stojanov y col., 1994; caballo: Arns y Shepherd, 1994; caprino: Pawshe y col., 1994). Sin embargo, apenas se han realizado estudios comparativos entre estos distintos métodos de selección de los espermatozoides y su efecto sobre la fecundación y desarrollo de ovocitos madurados *in vitro*.

En consecuencia, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del lavado y de la selección de los espermatozoides más móviles, sobre la tasa de penetración y división de los ovocitos de cabras prepúberes madurados *in vitro*, valorando también los diferentes parámetros seminales obtenidos con los distintos métodos. Para la consecución de este objetivo, se realizaron 3 experiencias en las que se compararon: 1) el lavado mediante centrifugación a través de una solución Ficoll, la selección y lavado mediante *swim-up* y la dilución de los espermatozoides como tratamiento control; 2) el *swim-up* respecto al lavado por centrifugación y 3) dos diferentes sistemas de lavado y selección de espermatozoides (*swim-up* vs gradientes Percoll).

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención y MIV de ovocitos foliculares de cabras prepúberes.

Se obtuvieron ovocitos foliculares de cabras prepúberes y se maduraron *in vitro* siguiendo la metodología descrita anteriormente.

Preparación de los espermatozoides

Para la realización de cada experiencia, se recogieron los eyaculados de 3 machos fértiles con ayuda de una vagina artificial, se mezclaron a partes iguales para minimizar la variación intermachos y se procesaron siguiendo distintos métodos de preparación o lavado.

Experiencia 1

a) Lavado mediante una solución de Ficoll.

Se diluyeron 400 µl de la mezcla de eyaculados en 800 µl de medio HEPES-TALP. Previamente, fueron colocados 5 ml de la solución de lavado que contenía Ficoll (7,5%) (Sigma, F-4375) descrito por Harrison (1976) en un tubo cónico. A continuación, se depositó muy cuidadosamente 1 ml de la suspensión de espermatozoides sobre la solución de lavado de Ficoll y se procedió a una centrifugación en 2 etapas (5 minutos a 700xg y 10 minutos a 900xg). Tras descartar el sobrenadante por aspiración, el sedimento fue reconstituido en 1 ml del medio HEPES-TALP. Posteriormente se resuspendió (1:1) en medio HEPES-TALP con heparina (100 µg/ml) y se incubó durante 45 minutos a 38,5°C.

b) *Swim-up*.

Se depositaron 50 µl de la mezcla de eyaculados en el fondo de un tubo cónico que contenía 2 ml del medio HEPES-TALP. Transcurrida una hora a 38,5°C, se recogieron 0.6 ml de la parte superior del tubo y se centrifugó a 200xg durante 10 minutos. Tras descartar el sobrenadante, el sedimento resultante se resuspendió (1:1) en medio HEPES-TALP con heparina (100 µg/ml) y se incubó durante 45 minutos a 38,5°C.

c) Tratamiento control.

Este tratamiento consistió en diluir 50 µl de la mezcla de eyaculados en 2 ml del medio HEPES-TALP. Seguidamente, una alícuota de esta suspensión se diluyó (1:1) en medio HEPES-TALP con heparina (100 µg/ml) y se incubó durante 45 minutos a 38,5°C.

Experiencia 2

a) *Swim-up* (ver metodología en experiencia 1).

b) Lavado mediante centrifugación.

Este método consistió en diluir 50 µl de la mezcla de eyaculados en 2 ml del medio HEPES-TALP y centrifugar a 200xg durante 10 minutos. A continuación, tras descartar el sobrenadante, el sedimento resultante se procesó siguiendo la misma metodología que en el método anterior.

Experiencia 3

a) *Swim-up* (ver metodología en experiencia 1).

b) Gradiente discontinuo de Percoll.

Se diluyó 400 µl de la mezcla de eyaculados en 800 µl de medio HEPES-TALP. Previamente, se preparó la solución isotónica de Percoll, diluyendo una parte de suero fisiológico concentrado 10 veces en 9 partes de solución Percoll (Sigma, P-1644). Seguidamente, se realizó un gradiente de Percoll en un tubo cónico colocando 1 ml de una solución del 80%

de Percoll debajo de 1 ml de una solución del 40% de Percoll con ayuda de una jeringuilla. Ambas soluciones se realizaron diluyendo el Percoll en un medio de sacarosa descrito por Harrison (1976). A continuación se depositó cuidadosamente 1 ml de la suspensión de espermatozoides sobre el gradiente y se centrifugó a 800 x g durante 20 minutos. Una vez eliminado el sobrenadante, el sedimento fue reconstituido en 1 ml del medio HEPES-TALP y se procedió a una segunda centrifugación a 800xg. Transcurridos 5 minutos, se descartó el sobrenadante y el sedimento fue de nuevo reconstituido en 1 ml del medio HEPES-TALP. Posteriormente se resuspendió (1:1) en medio HEPES-TALP con heparina (100 µg/ml) y se incubó durante 45 minutos a 38,5°C.

FIV y cultivo de embriones

Tras los 45 minutos de preincubación en medio HEPES-TALP con heparina y coincidiendo con el final del cultivo de los ovocitos, se procedió a la inseminación de éstos. Una vez transcurridas 24 horas, los ovocitos se separaron de los espermatozoides y se transfirieron a la monocapa de células de la granulosa, todo ello según la metodología descrita anteriormente. A las 48 horas de la inseminación se evaluó la división de los embriones.

Valoración de los resultados

Tanto la recogida y procesamiento de las muestras de ovocitos como de espermatozoides, se realizaron siguiendo el método descrito en el apartado general de material y métodos. También el tratamiento estadístico de los resultados está descrito en el mismo apartado.

RESULTADOS

Experiencia 1

Motilidad, vitalidad y estado acrosomal

Los resultados referentes a las características seminales estudiadas en esta experiencia se muestran en la figura 1.

El tratamiento del *swim-up* incrementó significativamente ($p \leq 0.0001$) en relación a la muestra inicial de semen, los valores de motilidad (78% vs 60%), vitalidad (77,6% vs 63%) y acrosomas normales (92,5% vs 88,6%), siendo también estos valores superiores ($p \leq 0.0005$) a los obtenidos en el resto de tratamientos.

Los resultados obtenidos en el tratamiento de lavado mediante una solución Ficoll fueron inferiores significativamente a los valores obtenidos en el tratamiento control tanto en el porcentaje de vitalidad (50,6% vs 61,3%) como en el de acrosomas normales (71,1% vs 86,3%), siendo inferiores ($p \leq 0.0001$) también a los de la muestra inicial. Los resultados obtenidos en el tratamiento control no difirieron de los valores iniciales de la muestra de espermatozoides.

Después de la pre-incubación con heparina, los valores de motilidad y vitalidad (73% y 85,3%, respectivamente) obtenidos en el tratamiento de *swim-up* también fueron superiores significativamente al resto, no observándose diferencias entre los otros 2 tratamientos (53%

y 44,7% para el lavado en Ficoll; 58% y 52,5% para el tratamiento control). Respecto a los espermatozoides que presentaban un acrosoma normal, el porcentaje también fue significativamente superior en la muestra que había sido sometida al *swim-up* (90,8%), pero inferior ($p < 0.0001$) en el tratamiento de lavado mediante Ficoll (52,8%).

Al comparar los resultados obtenidos a las 17 horas de la inseminación, no se observó ningún efecto del tratamiento sobre la motilidad ni la vitalidad espermática. No obstante, el porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal fue significativamente superior en la muestra que había sido sometida anteriormente al *swim-up* (77,1%) respecto al obtenido en el tratamiento de lavado en Ficoll (45,7%) y al del tratamiento control (55,1%).

Respecto al porcentaje de espermatozoides vivos que habían sufrido la reacción acrosómica, no se observó ningún efecto del tratamiento durante el proceso, excepto a las 17 horas de la inseminación, donde el valor obtenido en el tratamiento de lavado mediante Ficoll fue significativamente inferior al resto.

Tasa de fecundación y de división

No se observaron diferencias significativas entre tratamientos en el porcentaje de ovocitos fecundados a las 17 horas de la inseminación. Tampoco se observó ningún efecto significativo del tratamiento en la formación de los dos pronúcleos ni en la incidencia de poliespermia u otras anormalidades. Respecto a la tasa de división de los ovocitos tampoco se observó ninguna diferencia significativa entre los tratamientos a los que habían sido sometidos los espermatozoides (Tabla 1).

Tabla 1: Efecto del lavado (Ficoll) y selección/lavado (*swim-up*) de los espermatozoides sobre la tasa de fecundación y división de los ovocitos¹ (n° de réplicas=5).

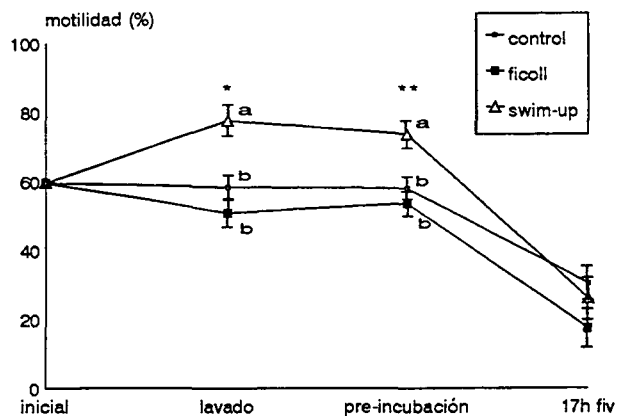
Tratamiento	17 horas post-inseminación % ovocitos penetrados (n°)					48 horas post-inseminación % embriones (n°)			
	n°	Total	2PN	PS	Anorm	n°	2 cel	>2 cel	Total División
Control	99	57,6 (57)	24,2 (24)	19,2 (19)	14,1 (14)	260	14,2 (37)	32,7 (85)	46,9 (122)
Ficoll	79	41,8 (33)	16,5 (13)	15,2 (12)	10,1 (8)	268	13,1 (35)	23,5 (63)	36,6 (98)
Swim-up	97	38,1 (37)	19,6 (19)	12,4 (12)	6,2 (6)	290	12,1 (35)	16,9 (49)	29,0 (84)

Ovocitos penetrados: 2PN= 2 pronúcleos + cola del espermatozoide, PS= poliespérmicos, Anorm= fecundados de forma anormal.

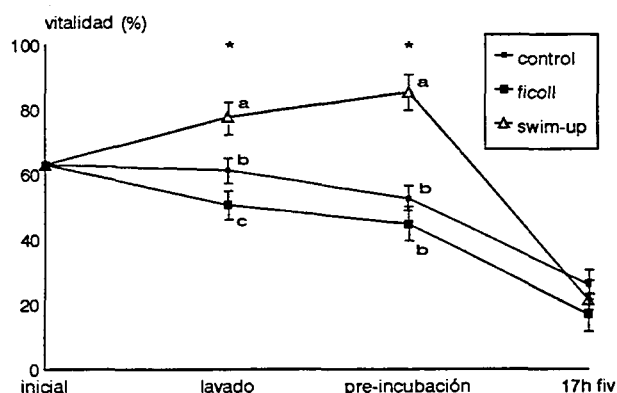
Embriones: 2cel= embriones de 2 células, >2cel= embriones de más de 2 células.

¹: valores expresados como frecuencia.

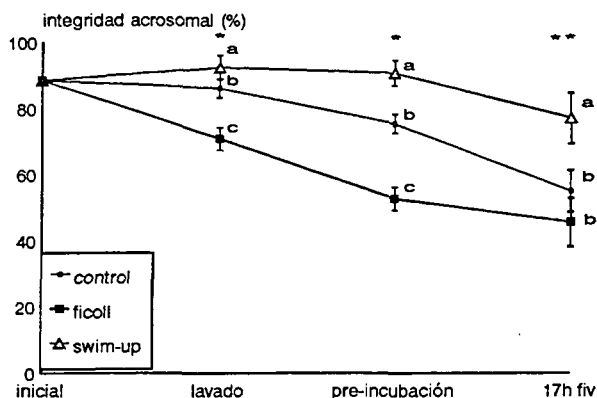
Figura 1: Efecto del lavado (Ficoll) y selección/lavado (*swim-up*) de los espermatozoides durante su tratamiento para la FIV sobre el porcentaje de (a) motilidad, (b) vitalidad, (c) integridad del acrosoma y (d) reacción acrosómica verdadera.



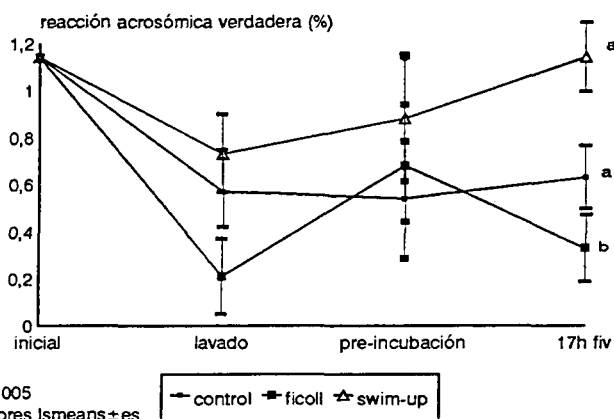
* $p \leq 0.0005$, ** $p \leq 0.001$
 1: valores expresados como $1s \text{ means} \pm es$



* $P \leq 0.0001$
 1: valores expresados como $1s \text{ means} \pm es$



* $p < 0.0001$, ** $p < 0.05$
 1: valores expresados como $1s \text{ means} \pm es$



* $p < 0.005$
 1: valores $1s \text{ means} \pm es$

Experiencia 2

Motilidad, vitalidad y estado acrosomal

Los resultados referentes a los parámetros seminales estudiados se muestran en la figura 2.

Los porcentajes de motilidad (79%) vitalidad (77,5%) y acrosomas normales (91,4%) obtenidos con la técnica del *swim-up* fueron significativamente superiores a los valores iniciales (60%, 63% y 87%, respectivamente) de la muestra de espermatozoides, así como también a los resultados obtenidos con el lavado mediante una centrifugación (62%, 62,4% y 75,4%, respectivamente), no difiriendo éste último de los de la muestra inicial.

Tras los 45 minutos de pre-incubación con heparina, los resultados de motilidad, vitalidad e integridad acrosomal (77%, 69,5% y 83,9% respectivamente) obtenidos en la muestra de espermatozoides que había sido sometida al *swim-up* continuaron siendo superiores significativamente a los obtenidos mediante la centrifugación (52%, 45,6% y 62,3%).

Transcurridas 17 horas del inicio de la inseminación, se observaron también diferencias significativas entre los tratamientos de *swim-up* y lavado por centrifugación, respecto al porcentaje de espermatozoides móviles (48% vs 35%), vivos (28,4% vs 19,2%) y con acrosoma normal (60,7% vs 32,7%). Respecto al porcentaje de espermatozoides vivos que reaccionaron, no se observó ningún efecto del tratamiento durante todo el proceso.

Tasa de fecundación y de división

No se observó ningún efecto del tratamiento al que habían sido sometidos los espermatozoides sobre la tasa de fecundación o la formación de los pronúcleos. De la misma manera, tampoco se apreciaron diferencias significativas en el porcentaje de ovocitos divididos a las 48 horas de la inseminación (Tabla 2).

Tabla 2: Efecto de la selección de los espermatozoides mediante la técnica del *swim-up* sobre la tasa de penetración y división de los ovocitos¹ (n° de réplicas=7).

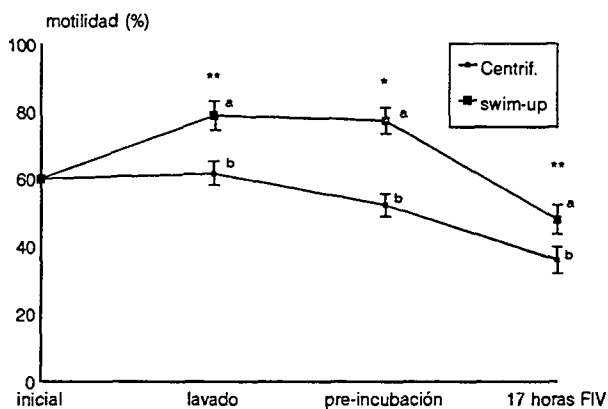
Método de lavado	17 horas post-inseminación % ovocitos penetrados (n°)					48 horas post-inseminación % embriones (n°)			
	n°	Total	2PN	PS	Anorm	n°	2 cel	>2 cel	Total División
Swim-up	120	49,1 (59)	20,0 (24)	21,6 (26)	7,5 (9)	386	22,3 (86)	21,2 (82)	43,5 (168)
Centrifugación	137	55,5 (76)	13,9 (19)	29,9 (41)	11,7 (16)	437	22,0 (96)	28,8 (126)	50,8 (222)

Ovocitos penetrados: 2PN= 2 pronúcleos + cola del espermatozoide, PS= poliespérmicos, Anorm= fecundados de forma anormal.

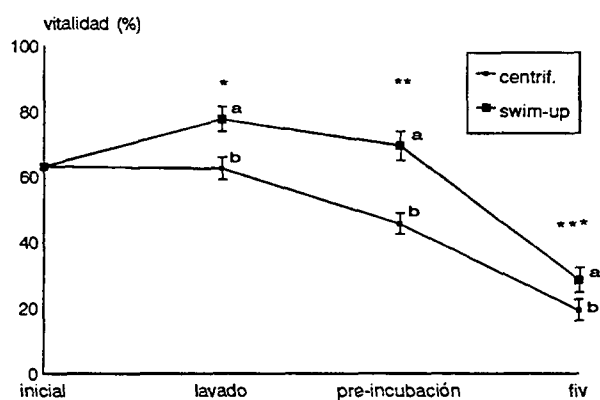
Embriones: 2cel= embriones de 2 células, >2cel= embriones de más de 2 células.

¹: valores expresados como frecuencia.

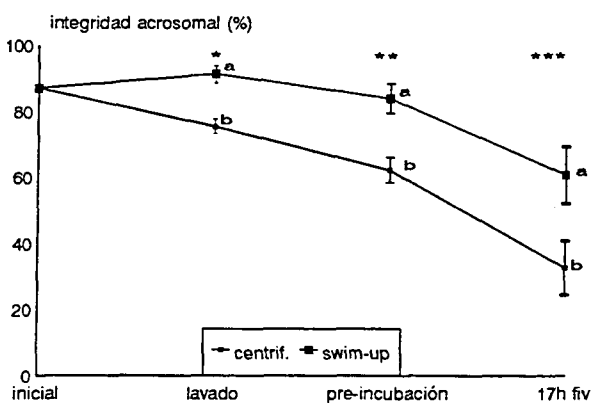
Figura 2: Efecto de la selección de los espermatozoides mediante la técnica de *swim-up* sobre el porcentaje de (a) motilidad, (b) vitalidad, (c) integridad del acrosoma y (d) reacción acrosómica verdadera.



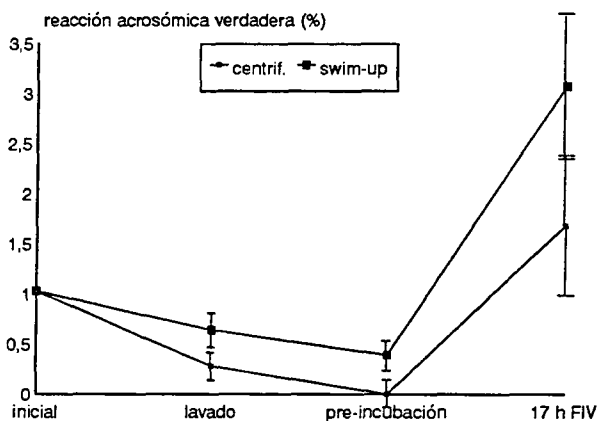
*P<0.005, **p<0.05
1: valores expresados como $1s \text{ means} \pm es$



* p<0.001, ** p<0.01, *** p<0.05
1: valores expresados como $1s \text{ means} \pm es$



*P<0.0001, ** p<0.01, *** p<0.05
1: valores $1s \text{ means} \pm es$



1:valores $1s \text{ means} \pm es$

Experiencia 3

Motilidad, vitalidad y estado acrosomal

Los resultados referentes a las características seminales estudiadas en esta experiencia se muestran en la figura 3.

Al comparar los resultados obtenidos tras realizar los diferentes tratamientos, no se apreciaron diferencias significativas en el porcentaje de motilidad y acrosomas normales entre los tratamientos ni respecto a los valores iniciales de la muestra de espermatozoides. No obstante, si se observó un aumento significativo en el porcentaje de espermatozoides vivos en la muestra que había sido sometida al tratamiento del *swim-up* (81,5%) respecto a los valores de la muestra inicial (74,5%) y a los obtenidos en el tratamiento de lavado/selección mediante gradiente discontinuo de Percoll (69,1%). Los valores obtenidos en este último tratamiento no difirieron de los valores iniciales.

Respecto al resto del proceso no se observaron diferencias significativas entre los dos tratamientos en ninguno de los parámetros estudiados.

Tasa de fecundación y de división

Los resultados referentes a la tasa de fecundación y división de los ovocitos en esta experiencia se muestran en la Tabla 3.

No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de ovocitos fecundados entre los diferentes tratamientos a los que habían sido sometidos los espermatozoides. Así como tampoco se observó ningún efecto significativo en la formación de los pronúcleos ni en el porcentaje de ovocitos divididos.

Tabla 3: Efecto del método de lavado y selección de los espermatozoides sobre la tasa de penetración y división de los ovocitos¹ (n° de réplicas=3).

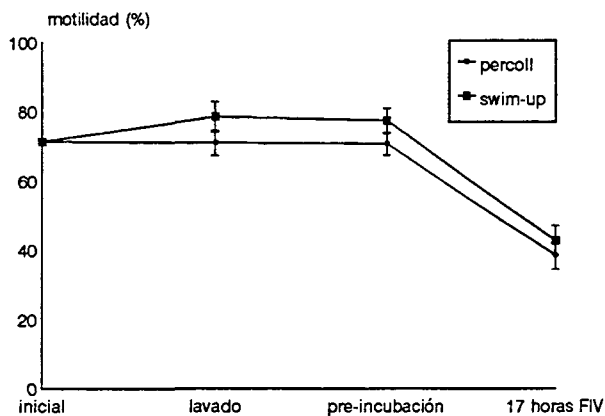
Método selección- lavado	17 horas post-inseminación % ovocitos penetrados (n°)					48 horas post-inseminación % embriones (n°)			
	n°	Total	2PN	PS	Anorm	n°	2 cel	>2 cel	Total División
Swim-up	49	42,9 (21)	20,4 (10)	10,2 (5)	12,2 (6)	218	20,2 (44)	14,2 (31)	34,4 (75)
Gradiente Percoll	72	55,6 (40)	30,6 (22)	19,4 (14)	5,6 (4)	192	18,2 (35)	17,7 (34)	35,9 (69)

Ovocitos penetrados: 2PN= 2 pronúcleos + cola del espermatozoide, PS= poliespérmicos, Anorm= fecundados de forma anormal.

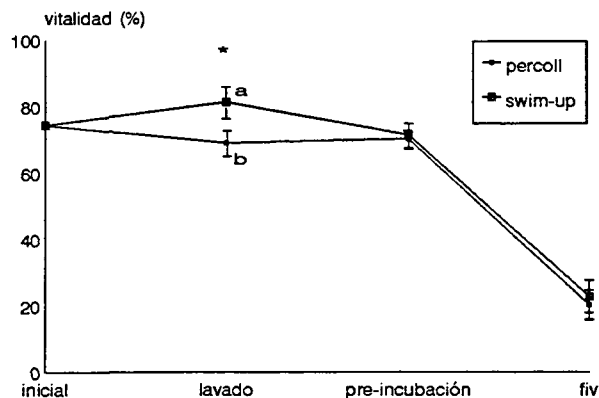
Embriones: 2cel= embriones de 2 células, >2cel= embriones de más de 2 células.

¹: valores expresados como frecuencia.

Figura 3: Efecto del método de selección y lavado de los espermatozoides (*swim-up* versus gradientes de Percoll) sobre el porcentaje de (a) motilidad, (b) vitalidad, (c) integridad del acrosoma y (d) reacción acrosómica verdadera.

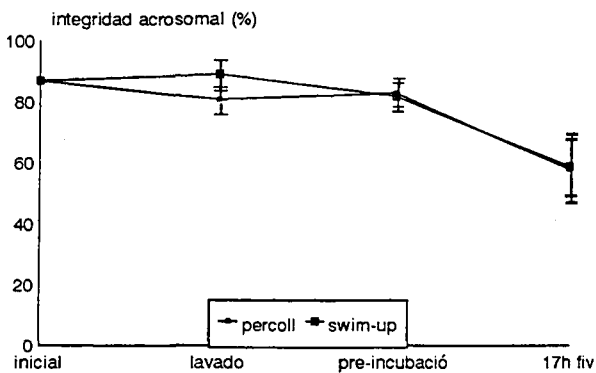


1: valores \pm es

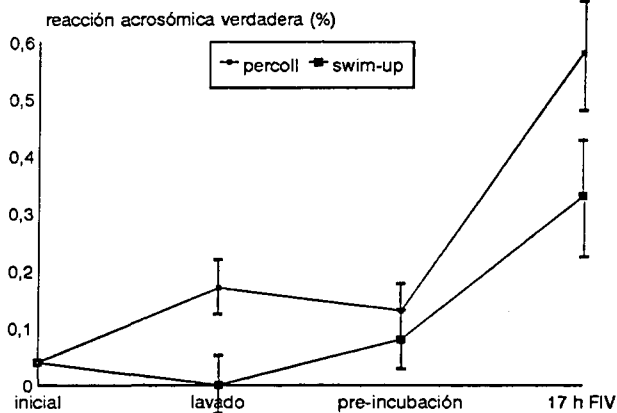


*P<0.01

1: valores \pm es



1: valores \pm es



1: valores \pm es

DISCUSIÓN

Los distintos métodos de preparación de los espermatozoides para la FIV utilizados en este trabajo no mostraron efectos significativos en la tasa de penetración y división *in vitro* de los ovocitos, a pesar de haberse encontrado diferencias significativas en los parámetros seminales estudiados entre los distintos sistemas utilizados. Estos resultados indican que, bajo nuestras condiciones *in vitro*, un número suficiente de espermatozoides son capacitados, sufren la reacción acrosómica y son capaces de fecundar los ovocitos, aunque no hayan sido previamente seleccionados ni incluso lavados para eliminar el plasma seminal.

El lavado de los espermatozoides para eliminar el plasma seminal, previo a su uso en la FIV, es considerado esencial, no sólo porque acelera la capacitación (Oliphant y Brackett, 1973), eliminando probablemente los componentes inhibitorios del plasma de la superficie del espermatozoide (Brackett y Oliphant, 1975), sino también porque el plasma seminal parece tener cierta actividad lítica de los ovocitos (Ijaz y col., 1989). No obstante, la ausencia de un efecto significativo de la presencia de plasma seminal en el presente trabajo, sobre los porcentajes de penetración y división de los ovocitos, podría ser debido a la alta dilución a la que es sometida la mezcla de eyaculados (x1000) a lo largo del proceso de preparación de los espermatozoides. Esta dilución provoca probablemente una disminución del efecto decapacitante del plasma seminal.

En estudios realizados en espermatozoides de cerdo no sólo no se observó un efecto negativo del plasma, sino que se obtuvieron mejores porcentajes de penetración de ovocitos inmaduros cuando se utilizaron espermatozoides que no habían sido lavados (Martínez y col., 1994). Estos resultados coinciden con los resultados obtenidos en nuestro trabajo, donde a pesar de no existir diferencias estadísticamente significativas, existe cierta superioridad en el porcentaje de penetración y división (57.6%, 46.9% respectivamente) de los ovocitos de cabras prepúberes inseminados con espermatozoides que fueron simplemente diluidos, respecto a los que se obtuvieron cuando se inseminaron con espermatozoides lavados a través de una solución de Ficoll (41.8% y 36.6%, respectivamente) o mediante la técnica del swim-up (38.1% y 29.0%, respectivamente). Tampoco la eliminación del plasma seminal parece ser requerida en espermatozoides de gato para penetrar ovocitos heterólogos (Howard y col., 1988).

Ijaz y col. (1989) no observaron un efecto en la penetración de ovocitos de hámster libres de zona cuando se inseminaron con espermatozoides bovinos lavados previamente, a los cuales se les añadió plasma seminal en una concentración de 1:4000 después de un periodo de incubación de 4 horas. A esta dilución, la adición de plasma seminal a los espermatozoides capacitados no produjo ningún efecto en su capacidad de penetración, a pesar de haber sido demostrado que el plasma seminal tiene la habilidad de revertir el proceso de la capacitación (Dukelow y col., 1967, citado por Ijaz y col., 1989).

Como ya se ha citado anteriormente, el efecto del plasma seminal, sobre la motilidad, supervivencia e integridad de los espermatozoides, ha sido a menudo tema de estudio y controversia. Thompson y Cummins (1985) no observaron ningún efecto de la eliminación del plasma seminal, mediante centrifugación, sobre la supervivencia de los espermatozoides de morueco después de 12 horas de incubación. Tampoco nuestros resultados mostraron diferencias significativas en los porcentajes de motilidad y vitalidad obtenidos a las 17 horas

del co-cultivo de los gametos entre los espermatozoides que habían sido lavados (*swim-up* y Ficoll) y los que no (control). No obstante, sí se observaron diferencias durante los procesos de preparación de los espermatozoides, previos a la inseminación de los ovocitos, en estos parámetros, así como también en el porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto .

Contrariamente a lo descrito por algunos autores, el lavado por simple centrifugación no causó ningún efecto sobre las características iniciales que presentaban los espermatozoides. Por el contrario, cuando la centrifugación se realizó a través de un medio de alta densidad como la solución de Ficoll, con el fin de reducir el efecto perjudicial del lavado como propuso Harrison (1976), el resultado obtenido fue el opuesto a lo esperado, observándose porcentajes de vitalidad y de acrosomas intactos significativamente inferiores a los que presentaban los espermatozoides inicialmente. No hemos podido encontrar una explicación sobre los resultados aquí obtenidos, ya que según Harrison (1976) parece improbable que el Ficoll ejerza un efecto tóxico en las células, sugiriendo que la falta de motilidad observada en algunas especies, tras realizar este tipo de lavado, sea debida muy probablemente al efecto del alto grado de eliminación del plasma seminal conseguido con este método.

Parrish y col. (1985a,b, 1986) describieron por primera vez el efecto positivo de la técnica del *swim-up* sobre la tasa de fecundación con semen congelado bovino, convirtiéndose así en un paso habitual en la FIV para la selección de espermatozoides altamente móviles.

En el presente trabajo se ha observado que la técnica del *swim-up* mejora significativamente la motilidad, vitalidad e integridad acrosomal de la población inicial de espermatozoides, mientras que los otros métodos utilizados, no sólo no son capaces de mejorar dichas características, sino que incluso, como es el caso del Ficoll, pueden provocar un efecto negativo sobre los espermatozoides. Sin embargo, la capacidad de selección de los espermatozoides del *swim-up* no se ve reflejada en un aumento de la tasa de penetración y división de los ovocitos, no observándose diferencias estadísticamente significativas con los resultados obtenidos mediante los otros métodos de lavado o incluso con los obtenidos mediante únicamente la dilución del semen. Resultados similares obtuvieron Howard y col. (1988), quienes tampoco observaron diferencias significativas en la tasa de penetración de ovocitos de hámster libres de zona, cuando éstos fueron inseminados con espermatozoides de gato que habían sido diluidos, lavados o seleccionados mediante la técnica del *swim-up*.

En los laboratorios de FIV humana, a pesar de los distintos métodos de preparación de los espermatozoides desarrollados en los últimos años, la técnica del *swim-up* continua siendo el método más comúnmente utilizado (Ng y col., 1992). Sin embargo, el método de centrifugación por gradientes discontinuos de Percoll parece estar ganando aceptación, particularmente en ciertos casos de infertilidad. De hecho, numerosos han sido los trabajos realizados en esta especie referentes al estudio comparativo de estos dos sistemas de selección de los espermatozoides, siendo todavía los resultados obtenidos por los distintos grupos poco concluyentes. Para algunos autores la técnica del *swim-up* proporciona significativamente espermatozoides de mejor calidad respecto al Percoll, aunque no presente diferencias en la tasa de fecundación *in vitro* (Englert y col., 1992). Para otros, la selección de espermatozoides móviles fue similar en ambos métodos (Guerin y col., 1989), sin embargo la capacidad de fecundación *in vitro* fue superior en los espermatozoides separados mediante Percoll, tanto en la FIV homóloga aumentando la tasa de gestación (Guerin y col., 1989),

como en la FIV heteróloga de ovocitos de hámster libres de zona (Chan y Tucker, 1992). Asimismo, otros afirman que la técnica del Percoll selecciona los espermatozoides con una motilidad progresiva significativamente superior que mediante el swim-up (Akerlof y col., 1987), mejorando también la morfología, lo que parece estar ligado a un incremento de la tasa de gestación (Van der Zwalmen y col., 1991). Por otra parte, otros autores como Check y col. (1992) consideran que ninguno de estos métodos de selección produce un efecto en la integridad funcional de las membranas de los espermatozoides, valorado mediante el test de HOS respecto a la muestra inicial. No obstante, en lo que parece existir cierto acuerdo es en que la técnica del Percoll permite la recuperación de un mayor número de espermatozoides móviles.

Estas diferencias en los resultados obtenidos son difíciles de explicar, aunque probablemente la falta de uniformidad en la preparación de la técnicas, especialmente en la del Percoll, sea una de las principales causas, así como también la existencia de diferencias en las poblaciones de semen utilizado para la FIV. De hecho, ha sido sugerido individualizar el método con el fin de encontrar el óptimo para cada hombre (Check y col., 1992; Punjabi y col., 1990)

En las especies domésticas, pocos autores han utilizado la técnica del Percoll para la FIV, así como también son escasos los trabajos realizados que comparen este método con la técnica del *swim-up*. No obstante, Seidel y col. (1995), en el bovino, observaron que ambos métodos eran satisfactorios para su utilización en la FIV, ya que no se apreciaron diferencias significativas en la tasa de división de los ovocitos, a pesar de que el *swim-up* proporcionó un mayor porcentaje de espermatozoides móviles. En nuestros resultados tampoco se observaron diferencias significativas en la tasa de penetración y división de los ovocitos de cabras prepúberes entre estas técnicas. Sin embargo, el *swim-up* mejoró significativamente la vitalidad de los espermatozoides, respecto a la muestra inicial, así como también presentó valores superiores en los porcentajes de motilidad y acrosomas intactos, aunque no significativamente ($p=0.2$ y $p=0.07$, respectivamente). Estas diferencias en la eficacia de selección entre ambas técnicas podrían probablemente ser debidas a que los espermatozoides no-móviles, menos móviles o incluso muertos pueden ser forzados a bajar hacia la solución de Percoll de mayor densidad (80%), mientras que con la técnica del *swim-up*, sólo los móviles pueden migrar hacia la capa superior (Ng y col., 1992). No obstante, a pesar de no mejorar las características iniciales de los espermatozoides, la técnica de Percoll no produjo ningún efecto negativo, desapareciendo la diferencia significativa en el porcentaje de espermatozoides vivos respecto al *swim-up*, a lo largo del proceso.

Resumiendo, podemos concluir que a pesar de haber encontrado diferencias significativas en los parámetros seminales evaluados, después de realizar los distintos métodos de lavado y selección de espermatozoides, las mezclas de eyaculados utilizadas en el presente trabajo presentan unas características iniciales suficientemente aceptables para no influir de manera decisiva en los resultados de FIV. En consecuencia, en nuestro caso, y debido a la ausencia de efecto significativo de la preparación de los espermatozoides sobre la tasa de FIV, podría considerarse la utilización de otros métodos distintos al *swim-up* que fueran más rápidos, fáciles de ejecutar y que proporcionaran un mayor número de espermatozoides móviles tras su realización.

BIBLIOGRAFÍA

Aitken RJ, Clarkson JS. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J Androl* 1988; 9:367-376.

Akerlof E, Fredicson B, Gustafsson O, Lundin A, Lunell NO, Nylund L, Rosenborg L, Pousette A. Comparison between a swim-up and a Percoll gradient technique for the separation of human spermatozoa. *Int J Androl* 1987; 10:663-669.

Alvarez JG, Lasso JL, Blasco L, Nuñez RC, Heyner S, Caballero PP, Storey BT. Centrifugation of human spermatozoa induces sublethal damage; separation of human spermatozoa from seminal plasma by dextran swim-up procedure without centrifugation extends their motile lifetime. *Human Reprod* 1993; 8:1087-1092.

Arns MJ, Shepherd RE. Percoll gradient selection of equine spermatozoa enhances ability to bind and penetrate the zona pellucida. *Theriogenology* 1994;41:158.

Berger T, Marrs RP, Moyer DL. Comparison of techniques for selection of motile spermatozoa. *Fert Steril* 1985; 43:268-273.

Bolton VN, Braude PR. Preparation of human spermatozoa for in vitro fertilization by isopycnic centrifugation on self generating density gradient. *Arch Androl* 1984; 13:167-176.

Brackett BG, Oliphant G. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol Reprod* 1975;12:260-274.

Crozet N. Manipulation of oocytes and in-vitro fertilization. *J Reprod Fert* 1991a;Suppl43:235-243.

Chan SYW, Tucker MJ. Differential sperm performance as judged by the zona-free hamster egg penetration test relative to differing sperm penetration techniques. *Human Reprod* 1992;7(2):255-260.

Check JH, Katsoff D, Kozak J, Lurie. Effect of swim-up, Percoll and Sephadex sperm separation methods on the hypo-osmotic swelling test *Human Reprod* 1992;7(1):109-111.

Dukelow WR, Chernoff HN, Williams, WL. Properties of decapacitation factor and presence in various species. *J Reprod Fert* 1967;13:393.

Englert Y, Van der Bergh M, Rodesch C, Bertrand E, Biramane J, Legreve A. Comparative auto-controlled study between swim-up and Percoll preparation of fresh semen samples for in-vitro fertilization. *Human Reprod* 1992;7(3):399-402.

First NL, Parrish JJ. In-vitro fertilization of ruminants. *J Reprod Fert* 1987;Suppl34:151-165.

Fournier-Delpech S, Thibault C. Acquisition de la fécondance du spermatozoïde. En: Thibault C, Lévasseur MC (eds) *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. INRA-Editions Marketing, Paris, 1991:251-272.

Gellert-Mortimer ST, Clark GN, Baker WG, Hyne RV, Johnston WIH. Evaluation of nycodenz and Percoll density gradients for selection of motile human spermatozoa. *Fert Steril* 1988; 49:335-341.

Gordon I. Laboratory production of cattle embryos. CAB International. University Press, Cambridge, 1994.

Graham JK. Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process. *Theriogenology* 1994; 41:1151-1162.

Grant SA, Long SE, Parkinson TJ. Fertilizability and structural properties of boar spermatozoa prepared by Percoll gradient centrifugation. *J Reprod Fert* 1994; 100:477-483.

Guerin JF, Mathieu C, Lornage J, Pinatel MC, Bouliou D. Improvement of survival and fertilizing capacity of human spermatozoa in an IVF programme by selection on discontinuous Percoll gradients. *Hum Reprod* 1989; 4:798-804.

Hafez ESE. Transporte y sobrevivencia de los gametos. En: Reproducción e IA en animales. Hafez, ESE (Eds.). Interamericana, McGraw-Hill. 1989;182-204.

Harrison RAP, White IG. Some methods for washing spermatozoa from bull, boar and ram: a comparison using biochemical and other criteria. *J Reprod Fert* 1972; 29:271-284.

Harrison RAP. (1976) A highly efficient method for washing mammalian spermatozoa. *J Reprod Fert* 1976; 48:347-353.

Howard JG, Barone MA, Clingerman KJ, Bush M, Wildt DE. Influence of teratospermia, culture media and a sperm swim-up technique on penetration of zona-free hamster ova by domestic cat spermatozoa. *Proc 11th Inter Congr Anim Reprod* 1988: 332-334

Hyne RV, Stojanoff A, Clarke GN, Lopata A, Johnston WIH. Pregnancy from in vitro fertilisation of human eggs after separation of motile spermatozoa by density gradient centrifugation. *Fert Steril* 1986; 45:93-96.

Ijaz A, Hunter AG, Ayous M. Lysis of oocytes by bovine sperm and seminal plasma *J Dairy Sci* 1989; 72:3273-3279.

Jones RC, Holt WV. The effects of washing on the ultrastructure and cytochemistry of ram spermatozoa *J Reprod Fert* 1974; 41:159-167.

Keefer CL, Paprocki AM. Effect of Percoll following sperm separation on in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 1995; 43(1):244.

Mahadevan MM, Trounson AO. The influence of seminal characteristics on the success rate of human in vitro fertilization. *Fert Steril* 1984; 42(3):400-405.

Martínez E, Matas C, Vázquez JM, Roca J, Gadea J, Ruiz S, Coy P. Effect of washing and

- preincubation on in vitro capacitation of boar spermatozoa *Theriogenology* 1994; 41:248.
- Mermillod P, Wils C, Massip A, Dessy F. Collection of oocytes and production of blastocyst in vitro from individual, slaughtered cows. *J Reprod Fert* 1992; 96:717-723.
- Ng FLH, Liu DY, Baker HWG. Comparison of Percoll, mini-Percoll and swim-up methods for sperm preparation from anormal semen samples. *Human Reprod* 1992; 7(2):261-266.
- Oliphant G, Brackett BG. Capacitation of mouse spermatozoa in media with elevated ionic strength and reversible decapacitation with epididymal extract. *Fert Steril* 1973; 24:948-955.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, First NL. Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm in vitro. *Theriogenology* 1985a; 24(5):537-549.
- Parrish JJ, Susko-Parrish, JL, First NL. In vitro fertilization of bovine oocytes using heparin treated and swimup separated frozen thawed bovine semen is repeatable and results in high frequencies of fertilization. *Theriogenology* 1985b; 23:216.
- Pawshe CH, Totey SM, Jain SK. Methods of recovery of goat oocytes for in vitro maturation and fertilization. *Theriogenology* 1994 ; 42(1):117-125.
- Punjabi Y, Gerris J, Van Bijlen J, Delbeke L, Gielis M, Buytaert PH. Comparison between different pre-treatment techniques for sperm recovery prior to intrauterine insemination, GIFT or IVF. *Human Reprod* 1990; 5:78-83.
- Seidel GE Jr, Leipold SD, Shawki H. Preparation of bovine sperm for in vitro fertilization by swim-up or centrifugation through Percoll or BSA *Theriogenology* 1995; 43(1):319.
- Stojanov T, Robinson SJ, Rhodes SL, O'Brien JK, Evans G, Maxwell WMC. In vitro fertilisation with chilled-stored ram spermatozoa. *Theriogenology* 1994; 41:302.
- Thompson JGE, Cummins JM. The effects of washing and protein supplementation on the acrosome reaction of ram spermatozoa in vitro. *Animal Reprod Sci* 1985; 9:75-86.
- Utsumi K, Kato H, Iritani A. Full-term development of bovine follicular oocytes matured in culture and fertilized in vitro *Theriogenology* 1991; 35(4):695-703.
- Van Soom A, Van Vlaenderen I, Mahmoudzadeh AR, Deluyker H, de Kruif A. Compaction rate of in vitro fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. *Theriogenology* 1992; 38:905-919.
- Van der Zwalmen P, Bertin-Segal B, Geerts L, Debauche C, Schoysman R. (1991) Sperm morphology and IVF pregnancy rates: comparison between Percoll gradient centrifugation and swim-up procedures. *Human Reprod* 1991; 6:581-588.

CAPÍTULO 5

**EFFECTO DE LA INDUCCIÓN DE LA CAPACITACIÓN
CON HEPARINA SOBRE LA FIV**

INTRODUCCIÓN

El efecto de diferentes glicosaminoglicanos (GAG) sobre la capacidad fecundante de los espermatozoides ha sido estudiada especialmente en el bovino. GAG de distinta procedencia han sido probados para valorar su potencia relativa, siendo la heparina (procedente de la mucosa intestinal porcina), la más potente en inducir la capacitación en espermatozoides epididimarios bovinos (revisado por Miller y Ax, 1990). Parrish y col. (1985a) demostraron que la heparina podía preparar a los espermatozoides (epididimarios y eyaculados) para la FIV. Diversas evidencias sugieren que la heparina actúa durante la capacitación, facilitando indirectamente la reacción acrosómica, por lo que ha sido considerada más como un agente capacitante que como un inductor de la reacción acrosómica (revisado por Miller y Ax, 1990).

La unión de la heparina al espermatozoide parece ser necesaria para la inducción de la capacitación. Ha sido demostrado en el bovino que la heparina se une a la membrana del espermatozoide, mediante una unión del tipo ligando-receptor (Handrow y col., 1984), probablemente mediante proteínas de unión de la membrana plasmática del espermatozoide procedentes del plasma seminal (Miller y col., 1990; Nass y col., 1990; Thérien y col., 1995). Además Parrish y col. (1988) han demostrado que la heparina induce la capacitación de los espermatozoides de manera dosis-dependiente.

Poco se conoce del mecanismo de acción de la heparina en la inducción de la capacitación. No obstante, existen importantes evidencias que sugieren que la heparina estimula la entrada de Ca^{2+} y la alcalinización intracelular en espermatozoides bovinos (Handrow y col., 1986; Parrish y col., 1989). Leclerc y col. (1992) han demostrado que la heparina reduce la concentración de calmodulina en el espermatozoide durante la capacitación, lo que podría reducir la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa y permitir un incremento del Ca^{2+} intracelular.

Muchos han sido los esfuerzos que se han realizado para establecer un procedimiento de capacitación *in vitro* de espermatozoides en las distintas especies domésticas para su utilización en la FIV. Diferentes sistemas han sido propuestos, pero probablemente el método más fisiológico y repetible sea el tratamiento de los espermatozoides con heparina (Parrish y col., 1985b), aunque todavía existen considerables variaciones, incluso en el bovino, en las tasas de fecundación entre eyaculados y machos (Parrish y col., 1988; Ohgoda y col., 1988). Así, a pesar de su extendida utilización, las condiciones óptimas de este tratamiento no han sido totalmente establecidas, debido probablemente al efecto específico del macho respecto a la dosis de heparina utilizada (Leibfried-Rutledge y col., 1989; Marquant-LeGuienne y col., 1990). Además, mientras que ciertos autores adicionan la heparina directamente en el medio de FIV (Niwa y Ohgoda, 1988; Marquant-LeGuienne y col., 1990), otros someten a los espermatozoides a una incubación con heparina previa a la inseminación de los ovocitos. En semen congelado bovino, un tiempo de pre-incubación de unos 15 minutos con una concentración de heparina de 10 μ g/ml en el medio es considerado generalmente satisfactorio (revisado por Brackett y Zuelke, 1993), aunque algunos autores varían tanto el tiempo (Fukui y col., 1990) como la concentración (Choi y col., 1991; Lu y Gordon, 1988).

En el caprino, la adición de 10 μ g/ml de heparina en el medio de pre-incubación ha sido utilizada para la capacitación *in vitro* de espermatozoides frescos por Younis y col. (1991) y por Keskintepe y col. (1994), utilizando tiempos de pre-incubación de 5 y 30 minutos,

respectivamente. No obstante, Keskinetepe y col. (1994) añadieron también cafeína (0.4 µg/ml) al medio, la cual actúa sinérgicamente con la heparina (Niwa y Ohgoda, 1988). También Cox y col., (1995) han observado que la adición de heparina en el medio de fecundación estimula la FIV caprina. No obstante, al igual que en el bovino, tampoco se ha logrado fijar la condiciones óptimas para obtener las mejores tasas de fecundación y división de los ovocitos.

Como consecuencia a esta falta de estandarización en el tratamiento de los espermatozoides en los procesos de FIV, los objetivos de este trabajo fueron estudiar el efecto sobre la penetración y división de los ovocitos, así como sobre diferentes parámetros seminales de: 1) la utilización de heparina en el medio de pre-incubación de los espermatozoides, 2) la concentración de heparina y 3) el tiempo de pre-incubación con heparina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención y MIV de ovocitos foliculares de cabras prepúberes.

Se obtuvieron ovocitos foliculares de cabras prepúberes y se maduraron *in vitro* siguiendo la metodología descrita en el apartado general de material y métodos.

Preparación de los espermatozoides

Se realizaron 3 experiencias, en cada una de las cuales se obtuvieron eyaculados de 3 machos fértiles y se mezclaron a partes iguales en el laboratorio para minimizar la variación inter-machos. A continuación, se procedió a realizar una selección y lavado de los espermatozoides mediante la técnica del *swim-up* descrita anteriormente. Una vez seleccionados y lavados, los espermatozoides fueron sometidos a distintos tratamientos de pre-incubación en las diferentes experiencias.

Experiencia 1

Una vez descartado el sobrenadante, el sedimento de espermatozoides resultante de la centrifugación realizada tras el *swim-up* fue dividido en 2 alicuotas. A continuación, una de estas alicuotas se diluyó (1:1) en medio HEPES-TALP que contenía 100 µg/ml heparina (concentración final= 50 µg/ml). La otra alicuota también fue resuspendida (1:1) en medio HEPES-TALP, pero en esta ocasión sin heparina. Ambas alicuotas se incubaron durante 45 minutos a 38,5°C.

Experiencia 2

En esta experiencia, el sedimento de espermatozoides resultante fue dividido en 3 alicuotas. Cada una de ellas fue resuspendida (1:1) en medio HEPES-TALP que contenía una concentración de heparina de 10, 100 y 200 µg/ml respectivamente, dando una concentración final en el medio de pre-incubación de 5, 50 y 100 µg/ml, respectivamente. Seguidamente, se incubaron durante 45 minutos a 38,5°C.

Experiencia 3

En esta ocasión, una vez descartado el sobrenadante, el sedimento de espermatozoides se diluyó (1:1) en medio HEPES-TALP que contenía 100 µg/ml heparina (concentración final= 50 µg/ml). Inmediatamente después y coincidiendo con el final del cultivo de los ovocitos, se extrajo una alícuota de esta suspensión de espermatozoides y se procedió a la inseminación de un grupo de ovocitos. A continuación, se procedió a realizar esta misma operación, cuatro veces más, a intervalos de 15 minutos, dando como resultado tiempos de pre-incubación de los espermatozoides de <1, 15, 30, 45 y 60 minutos. La temperatura de la pre-incubación fue también de 38,5°C.

FIV y cultivo de embriones

Tras el periodo de preincubación de los espermatozoides en el medio HEPES-TALP con o sin heparina según el tratamiento y coincidiendo con el final del cultivo de los ovocitos, se procedió a la inseminación de éstos. A las 24 horas post-inseminación, los ovocitos se separaron de los espermatozoides y se transfirieron a la monocapa de células de la granulosa, todo ello según la metodología descrita anteriormente. A las 48 horas de la inseminación se evaluó la división de los embriones.

Valoración de los resultados

Tanto la recogida y procesamiento de las muestras de ovocitos como de espermatozoides, se realizaron siguiendo el método descrito en el apartado general de material y métodos. También el tratamiento estadístico al que fueron sometidos los resultados está descrito en el mismo apartado.

RESULTADOS

Experiencia 1

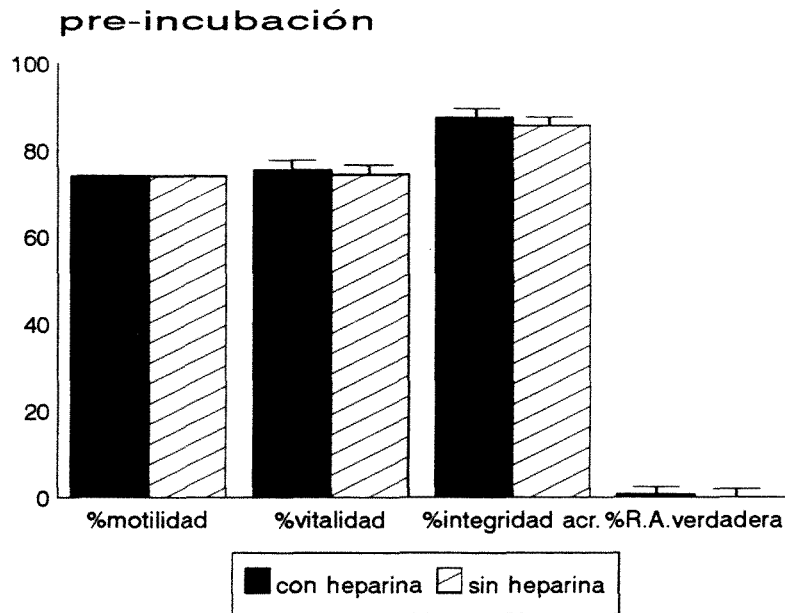
Motilidad, vitalidad y estado acrosomal

Los resultados referentes a las características seminales estudiadas en esta experiencia se muestran en la figura 1.

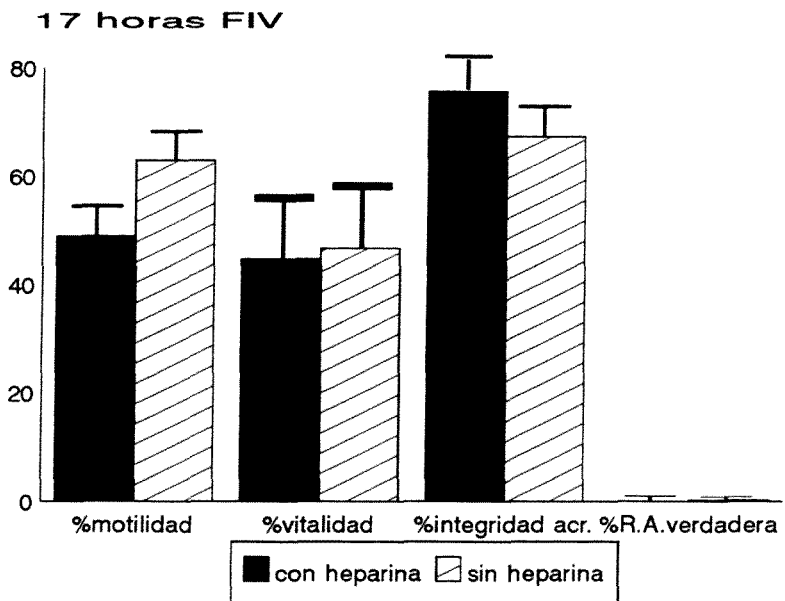
Al comparar los resultados obtenidos después de realizar los diferentes tratamientos, no se apreciaron diferencias significativas en el porcentaje de motilidad, vitalidad, acrosomas normales y de espermatozoides vivos reaccionados entre las muestras de espermatozoides que habían sido incubadas con o sin heparina. Así como tampoco se apreciaron diferencias entre los valores obtenidos antes y después de la pre-incubación.

Respecto a los resultados obtenidos tras 17 horas de cultivo con los ovocitos tampoco se observaron diferencias significativas entre los tratamientos.

Figura 1: Efecto de la presencia de heparina en la pre-incubación de los espermatozoides sobre el porcentaje de (a) motilidad, (b) vitalidad, (c) integridad del acrosoma y (d) reacción acrosómica verdadera.



1:valores \pm es



1:valores \pm es

Tasas de penetración y división

Como se muestra en la Tabla 1, la presencia de heparina en la pre-incubación de los espermatozoides y posterior FIV mejoró los porcentajes de penetración de los ovocitos (29,1% vs 6,7%, $p < 0.005$) y de fecundación normal (16,3% vs 3,4%, $p < 0.05$) valorados a las 17 horas post-inseminación, no observándose diferencias significativas en la incidencia de poliespermia. Asimismo, la heparina afectó positivamente al número total de ovocitos divididos (23,6% vs 3,9%, $p < 0.0001$) valorados a las 48 horas de la inseminación, así como al porcentaje de embriones que presentaban más de 2 células (12,9% vs 1,8%).

Tabla 1: Efecto de la presencia de heparina en la pre-incubación de los espermatozoides sobre la tasa de penetración y división de los ovocitos¹ (n° de réplicas=5).

Tratamiento pre-incubación	17 horas post-inseminación % ovocitos penetrados (n°)				48 horas post-inseminación % embriones (n°)				
	n°	Total	2PN	PS	Anorm	n°	2 cel	>2 cel	Total División
Heparina (50 µg/ml)	86	29,1 ^a (25)	16,3 ^a (14)	4,7 (4)	8,1 (7)	178	10,7 ^a (19)	12,9 ^a (23)	23,6 ^a (42)
Sin Heparina	89	6,7 ^b (6)	3,4 ^b (3)	0,0 (0)	3,4 (3)	229	2,2 ^b (5)	1,8 ^b (4)	3,9 ^b (9)

Ovocitos penetrados: 2PN= 2 pronúcleos + cola del espermatozoide, PS= poliespérmicos, Anorm= fecundados de forma anormal.

Embriones: 2cel= embriones de 2 células, >2cel= embriones de más de 2 células.

a,b: diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas $p < 0.05$.

¹: valores expresados como frecuencia.

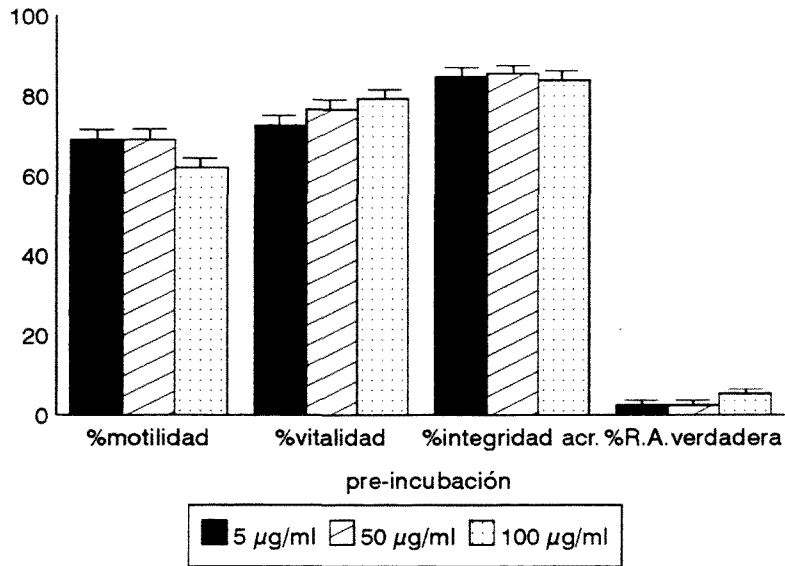
Experiencia 2

Motilidad, vitalidad y estado acrosomal

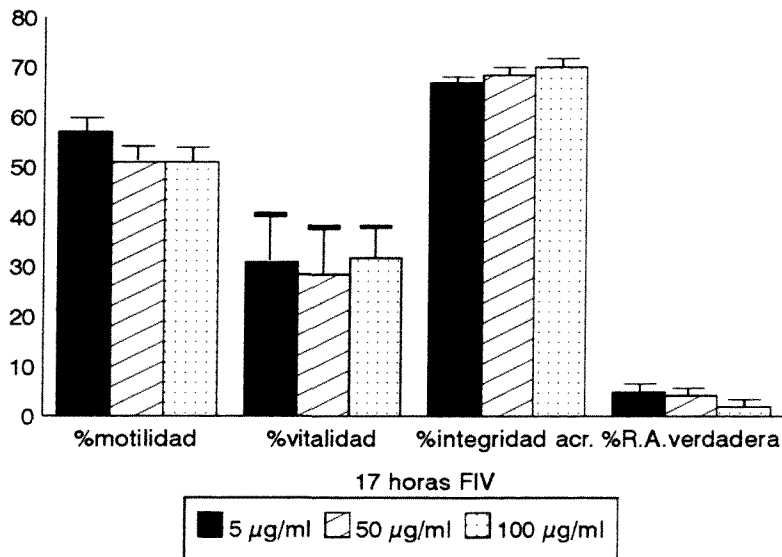
Los resultados referentes a las características seminales estudiadas en esta experiencia se muestran en la figura 2.

En nuestras condiciones la distinta concentración de heparina (5, 50 y 100 µg/ml), en el medio de pre-incubación de los espermatozoides, no tuvo ningún efecto en el porcentaje de motilidad, vitalidad, acrosomas normales y de espermatozoides vivos reaccionados. Así como tampoco se observaron diferencias entre los resultados obtenidos antes y después de los distintos tratamientos, a excepción del porcentaje de espermatozoides móviles que fue inferior ($p = 0.0001$) en todos los tratamientos respecto al valor obtenido antes de realizar la pre-incubación (89%).

Figura 2: Efecto de la concentración de heparina en el medio de pre-incubación de los espermatozoides sobre el porcentaje de (a) motilidad, (b) vitalidad, (c) integridad del acrosoma y (d) reacción acrosómica verdadera.



1: valores \pm es



1: valores \pm es

A las 17 horas de la inseminación, tampoco se observó ningún efecto del tratamiento en los parámetros seminales valorados.

Tasas de penetración y división

Los resultados referentes a la tasa de penetración y de división de los ovocitos de esta experiencia se muestran en la Tabla 2.

No se observó ningún efecto significativo entre tratamientos en el porcentaje de ovocitos penetrados a las 17 horas de la inseminación, ni en la formación de los dos pronúcleos. Sin embargo, la incidencia de poliespermia fue superior en el tratamiento de mayor concentración de heparina (19%), aunque las diferencias no fueron significativas ($p=0.34$).

A las 48 horas post-inseminación se observaron valores significativamente inferiores en el porcentaje total de división y en el de embriones de más de 2 células (15,2% y 5,2%, respectivamente) en el tratamiento de 5 $\mu\text{g/ml}$ de heparina respecto al de 50 $\mu\text{g/ml}$ (39,4% y 23,4%, respectivamente) y al de 100 $\mu\text{g/ml}$ (34% y 18,3%, respectivamente), no difiriendo estos dos últimos tratamientos entre sí.

Tabla 2: Efecto de la concentración de heparina en la pre-incubación de los espermatozoides sobre la tasa de penetración y división de los ovocitos¹ (n° de réplicas=7).

[Heparina] ($\mu\text{g/ml}$)	17 horas post-inseminación % ovocitos penetrados (n°)					48 horas post-inseminación % embriones (n°)			
	n°	Total	2PN	PS	Anorm	n°	2 cel	>2 cel	Total División
5	97	32,0 (31)	15,5 (15)	8,3 (8)	6,2 (6)	381	10,0 (38)	5,2 ^a (20)	15,2 ^a (58)
50	114	32,5 (37)	14,0 (16)	6,1 (7)	10,5 (12)	355	16,1 (57)	23,4 ^b (83)	39,4 ^b (140)
100	121	49,6 (60)	17,4 (21)	19,0 (23)	11,6 (14)	394	15,7 (62)	18,3 ^b (72)	34,0 ^b (134)

Ovocitos penetrados: 2PN= 2 pronúcleos + cola del espermatozoide, PS= poliespérmicos, Anorm= fecundados de forma anormal.

Embriones: 2cel= embriones de 2 células, >2cel= embriones de más de 2 células.

a,b: diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas $p<0.05$.

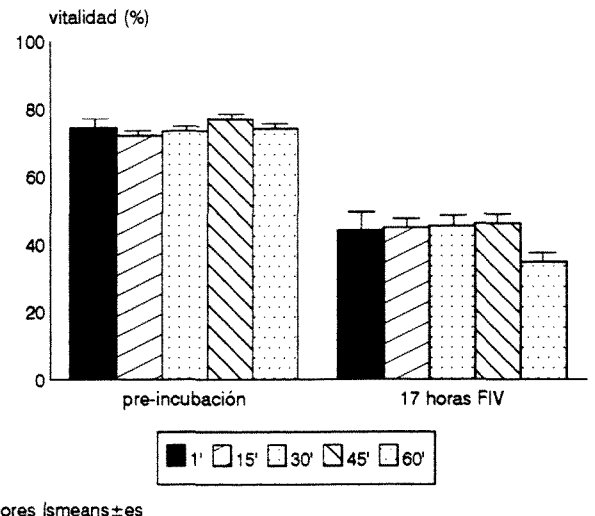
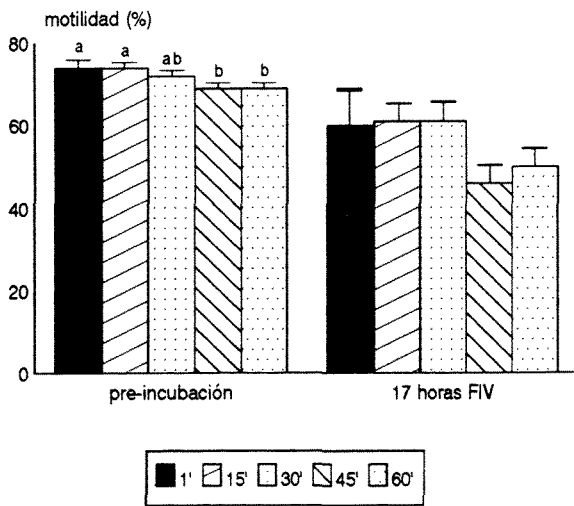
¹: valores expresados como frecuencia.

Experiencia 3

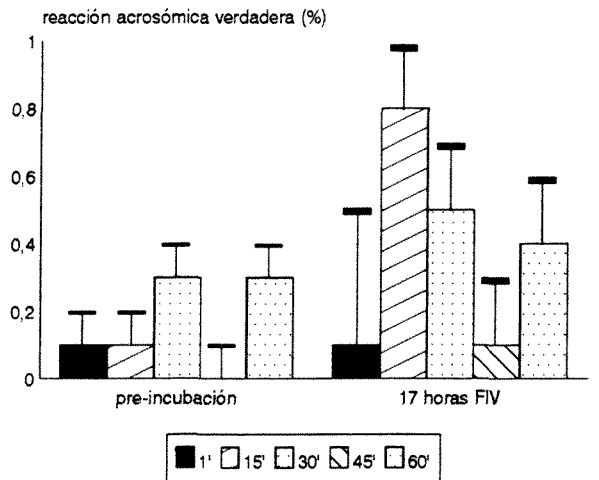
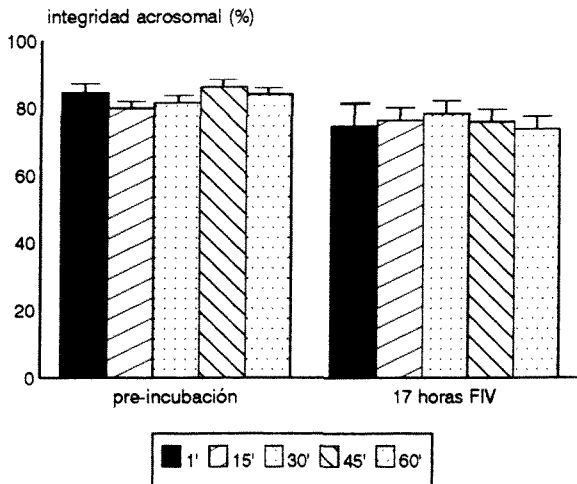
Motilidad, vitalidad y estado acrosomal

Los resultados referentes a las características seminales estudiadas en esta experiencia se muestran en la figura 3.

Figura 3: Efecto del tiempo de pre-incubación de los espermatozoides con la heparina (50 µg/ml) sobre el porcentaje de (a) motilidad, (b) vitalidad, (c) integridad del acrosoma y (d) reacción acrosómica verdadera.



P<0.05
1: valores \pm es



1: valores \pm es

1: valores \pm es

El tiempo de pre-incubación (1, 15, 30, 45 y 60 minutos) de los espermatozoides con la heparina no tuvo ningún efecto en el porcentaje de vitalidad, acrosomas normales y de espermatozoides vivos reaccionados valorados inmediatamente después de realizar los distintos tratamientos. Tampoco se observaron diferencias en los resultados obtenidos antes y después de la pre-incubación. No obstante, el porcentaje de espermatozoides móviles disminuyó significativamente después de ser pre-incubados durante 30, 45 y 60 minutos en comparación al valor obtenido antes de la pre-incubación (76%) y al resto de tiempos (1 y 15 minutos), a excepción del de 30 minutos que no difirió de ninguno de los tratamientos (ver figura 3).

Tampoco se observaron diferencias significativas, en ninguno de los parámetros valorados a las 17 horas de la inseminación, entre los espermatozoides que habían sido sometidos a distintos tratamientos.

Tasas de penetración y división

Los resultados referentes a la tasa de penetración y división de los ovocitos de esta experiencia se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Efecto del tiempo de pre-incubación de los espermatozoides con la heparina (50 µg/ml) sobre la tasa de penetración y división de los ovocitos¹ (nº de réplicas=4).

Tiempo Pre-incubación (minutos)	17 horas post-inseminación % ovocitos penetrados (nº)					48 horas post-inseminación % embriones (nº)			
	nº	Total	2PN	PS	Anorm	nº	2 cel	>2 cel	Total División
1	29	62,1 (18)	31,0 (9)	10,3 (3)	20,7 (6)	78	6,4 ^{ab} (5)	17,9 (14)	24,4 (19)
15	71	42,3 (30)	22,5 (16)	7,0 (5)	12,7 (9)	201	5,5 ^b (11)	20,4 (41)	25,9 (52)
30	73	61,6 (45)	24,7 (18)	20,6 (15)	16,4 (12)	209	12,4 ^a (26)	18,2 (38)	30,6 (64)
45	85	41,2 (35)	14,1 (12)	15,3 (13)	11,8 (10)	222	14,9 ^a (33)	15,3 (34)	30,2 (67)
60	76	47,4 (36)	17,1 (13)	9,2 (7)	21,1 (16)	197	16,2 ^a (32)	14,7 (29)	31,0 (61)

Ovocitos penetrados: 2PN= 2 pronúcleos + cola del espermatozoide, PS= poliespérmicos, Anorm= fecundados de forma anormal.

Embriones: 2cel= embriones de 2 células, >2cel= embriones de más de 2 células.

a,b: diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas p<0.05.

¹: valores expresados como frecuencia.

No se observó ningún efecto del tiempo de pre-incubación sobre la tasa de fecundación y formación de los 2 pronúcleos a las 17 horas de la inseminación. Tampoco se apreciaron diferencias significativas en el porcentaje total de ovocitos divididos ni en el porcentaje de embriones de más de 2 células valorados a las 48 horas de la inseminación. No obstante, sí se observaron diferencias en la proporción de embriones de 2 células, siendo este valor máximo cuando los espermatozoides fueron pre-incubados durante 1 hora en heparina (16,2%) y mínimo cuando lo fueron durante 15 minutos (5,5%).

DISCUSIÓN

Como se puede observar en el presente trabajo, la utilización de heparina en la pre-incubación de los espermatozoides aumentó significativamente la tasa de penetración y división de los ovocitos de cabras prepúberes respecto al tratamiento sin heparina. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Parrish y col. (1984, 1985a,b), quienes originalmente introdujeron la heparina en los sistemas de FIV bovina. Un incremento de la tasa de FIV de los ovocitos inseminados con espermatozoides congelados bovinos tratados con heparina ha sido observado por numerosos autores como Lu y Gordon (1988), Leclerc y col. (1992) o Saeki y col. (1995). En el caprino también ha sido observado este efecto beneficioso de la heparina en la capacitación *in vitro* de espermatozoides y en la FIV (Younis y col., 1991; Ling y col., 1992; Cox y col., 1994, 1995).

La presencia de heparina, la dosis y el tiempo de preincubación de los espermatozoides con la heparina han sido considerados factores importantes que afectan la fecundación y división *in vitro* (Fukui y col., 1990). De hecho, Parrish y col. (1988) demostraron que la heparina induce la capacitación de los espermatozoides de manera dosis-dependiente. También Lu y Gordon (1988) demostraron que la tasa de fecundación incrementaba a medida que la concentración de heparina aumentaba en el medio de pre-incubación de espermatozoides bovinos congelados en un rango de 0 a 100 µg/ml, favoreciendo también la formación de los 2 pronúcleos y la incidencia de poliespermia. Este mismo efecto ha sido observado sobre la tasa de fecundación normal, también con semen congelado bovino, por Fukui y col. (1990) al incrementar la concentración de heparina de 0 a 100 µg/ml, aunque la tasa disminuía al utilizar una dosis de 200 µg/ml respecto a concentraciones de 25, 50 y 100 µg/ml, observándose también un incremento en la incidencia de la poliespermia. Sin embargo, estos autores no observaron diferencias en la tasa de división entre las diferentes dosis de heparina utilizadas (25, 50, 100 y 200 µg/ml).

Asimismo, este efecto dosis-dependiente sobre la tasa de fecundación ha sido observado al añadir la heparina (0, 0.05, 0.1 y 0.2 µg/ml) directamente en el medio de FIV (Marquant-LeGuienne y col., 1990) también en espermatozoides congelados bovinos. También en el caprino, Cox y col. (1995) han observado un rápido incremento en la tasa de fecundación al añadir heparina en el medio de FIV a niveles que variaban entre 2.5 a 10 µg/ml dependiendo del macho.

En nuestro trabajo la concentración de heparina utilizada en la pre-incubación de los espermatozoides no afectó significativamente la frecuencia de penetración ni la proporción de ovocitos normalmente fecundados (2PN). Respecto a la incidencia de la poliespermia, a pesar de ser bastante superior en los ovocitos inseminados con espermatozoides que habían sido pre-incubados con la dosis más alta de heparina (100 µg/ml), tampoco se observaron diferencias

significativas. Esta ausencia de efecto de la concentración de heparina sobre la tasa de fecundación coincide con los resultados obtenidos en el bovino por Jiang y col. (1991) y por Saeki y col. (1995), quienes compararon distintas dosis de heparina en el medio de preincubación (10 y 100 $\mu\text{g/ml}$) y en el medio de fecundación (1, 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$), respectivamente. Tampoco en el caprino se observaron diferencias en la tasa de fecundación con concentraciones de heparina de 10 y 25 $\mu\text{g/ml}$ en el medio de FIV (Cox y col., 1994).

Al contrario de lo observado por Fukui y col. (1990), al analizar los resultados de división de los ovocitos obtenidos en este trabajo mediante los distintos tratamientos, se observó un efecto positivo en el porcentaje de embriones que habían superado el estadio de 2 células y en la tasa total de división con concentraciones de 50 ó 100 $\mu\text{g/ml}$ respecto a la de 5 $\mu\text{g/ml}$ de heparina, lo que parecería indicar que la cantidad de heparina introducida en el medio de FIV, en el momento de inseminar los ovocitos, tiene un efecto significativo en el desarrollo de los embriones. Guyader y col. (1990) examinaron el efecto de la concentración de heparina en el medio de FIV (rango: 0.05-2.0 $\mu\text{g/ml}$) sobre el desarrollo embrionario, obteniendo el máximo porcentaje de embriones cuando la FIV ocurría en presencia de 1 $\mu\text{g/ml}$ de heparina. En nuestro caso, la concentración final de heparina en el medio de FIV era de aproximadamente unos 0.25, 2.5 y 5 $\mu\text{g/ml}$, tras añadir 5 μl de la suspensión de espermatozoides que contenía una concentración de heparina de 5, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.

Cuando Parrish y col. (1984) utilizaron por primera vez un pre-tratamiento con heparina (10 $\mu\text{g/ml}$) de los espermatozoides bovinos para la FIV, el método que utilizaron implicaba una incubación de 4 horas para espermatozoides frescos y una media hora aproximadamente para el semen congelado. Desde entonces, numerosos trabajos han sido publicados no sólo para optimizar la dosis, sino también el tiempo de pre-incubación con heparina (Lu y Gordon, 1988; Fukui y col., 1990), aunque todavía existe una gran heterogeneidad en los tratamientos descritos en la bibliografía.

En nuestro trabajo no se observaron diferencias significativas en la frecuencia de penetración, fecundación normal ni poliespermia entre los ovocitos inseminados con espermatozoides que habían sido sometidos a distintos tiempos de pre-incubación con heparina (1, 15, 30, 45 y 60 minutos), así como tampoco en el porcentaje de ovocitos que superaron el estadio de 2 células o en el de división total. Tampoco Lu y Gordon (1988) encontraron diferencias en la tasa de FIV entre tiempos de pre-incubación de 15 y 30 minutos en espermatozoides bovinos congelados. Por el contrario, Fukui y col. (1990) observaron que periodos de preincubación de 60 minutos o superiores deprimían las tasas de fecundación respecto a periodos más cortos. Así como también observaron un efecto del tiempo sobre la tasa de división de los ovocitos cuando realizaron preincubaciones de 0, 15, 30 y 60, presentando este último tiempo una ligera tendencia a la superioridad.

Sin embargo, diversos laboratorios de FIV no realizan este pre-tratamiento, añadiendo la heparina directamente en el medio de FIV y obteniendo resultados perfectamente comparables a los obtenidos con la pre-incubación (Niwa y Ohgoda, 1988; Marquant-LeGuienne y col., 1990; Cox y col., 1995). Esto, junto con la ausencia de efecto del tiempo de pre-incubación observado en nuestros resultados, nos sugiere que la introducción de la heparina directamente en la gota de fecundación podría permitirnos la eliminación de este paso del proceso de la FIV.

Por otra parte, el porcentaje de reacción acrosómica espontánea verdadera obtenido después de realizar los distintos tratamientos no difirió significativamente entre los espermatozoides pre-incubados en ausencia o presencia de heparina, ni entre los que fueron sometidos a distintas concentraciones, así como tampoco entre los espermatozoides pre-incubados durante distintos tiempos. De hecho, Parrish y col. (1985b, 1988) observaron que los espermatozoides bovinos requerían una incubación con heparina de mínimo 4 horas antes de que los cambios relacionados con la capacitación fueran detectados mediante la habilidad de los espermatozoides a sufrir la RA tras una corta exposición a la fosfatidilcolina. Por lo que ha sido sugerido que los espermatozoides no parecen alcanzar la capacitación durante el periodo de swim-up y lavado ni incluso después del periodo de pre-incubación con heparina (generalmente 15 minutos), sino que se capacitarían durante el cultivo con los ovocitos (Parrish y col., 1986).

En conclusión, al igual que en otras especies, la utilización de heparina como agente capacitante en los sistemas de FIV de ovocitos de cabras prepúberes produce un aumento significativo en la tasa de penetración total y formación de los pronúcleos, así como también mejora la tasa de división de los ovocitos, sin afectar a la incidencia de poliespermia. Respecto a la concentración óptima de heparina en el medio de pre-incubación, a pesar de no observarse diferencias en la tasa de penetración entre los distintos tratamientos, los resultados obtenidos parecen indicar que una concentración de 50 µg/ml es suficiente para mejorar la división embrionaria, aumentando significativamente la proporción de embriones en estadio de más de 2 células, así como la de división total, sin incrementar la incidencia de poliespermia. No obstante, la concentración en el medio de 100 µg/ml de heparina no difirió en ningún parámetro valorado del tratamiento de 50 µg/ml. Además, la ausencia de efecto del tiempo de pre-incubación parece indicar que es la concentración de heparina introducida en el medio de fecundación la que determina la tasa de fecundación y especialmente de división de los ovocitos.

BIBLIOGRAFÍA

Brackett BG, Zuelke KA. Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology* 1993; 39:43-64.

Cox JF, Avila J, Saravia F, Santa María A. Assessment of fertilizing ability of goat spermatozoa by in vitro fertilization of cattle and sheep intact oocytes. *Theriogenology* 1994; 41:1621-1629.

Cox F, Saravia F, Briones M, Santa María A. Dose-dependent effect of heparin on fertilizing ability of goat spermatozoa. *Theriogenology* 1995; 44(3):451-460.

Choi YH, Fukui Y, Ono H. Effects of media and the presence of bovine epithelial cells during in vitro fertilization on fertilizability and developmental capacity of bovine oocytes. *Theriogenology* 1991; 36:863-873.

Fukui Y, Sonoyama T, Mochizuki H, Ono H. Effects of heparin dosage and sperm capacitation time on in vitro fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 1990; 34:579-591.

Guyader C, Marquant-Le Guienne B, Humblot P, Thibier M. Effect of heparin concentration on in vitro development of bovine eggs. Proc 6th European Embryo Transfer Assoc, Lyon, 1990: 150.

Handrow RR, Parrish JJ, First NL. Heparin stimulates calcium uptake by bovine sperm in vitro. J Androl 1986;7:23.

Jiang S, Yang X, Chang S, Heuwieser W, Foote RH. Effect of sperm capacitation and oocyte maturation procedures on fertilization and development of bovine oocytes in vitro. Theriogenology 1991; 35(1):218.

Keskintepe L, Darwish GM, Kenimer AT, Brackett BG. Term development of caprine embryos derived from immature oocytes in vitro. Theriogenology 1994; 42:527-535.

Leclerc P, Sirard MA, Chafouleas JG, Lambert RD. Decrease in calmodulin concentrations during heparin-induced capacitation in bovine spermatozoa. J Reprod Fert 1992; 94:23-32.

Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Parrish JJ, First NL. In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. Theriogenology 1989; 31:61-73.

Ling L, Jufen Q, Yong Z. In vitro fertilization of goat ovarian oocytes. Theriogenology 1992; 37:247.

Lu K, Gordon I. Effect of heparin on the capacitation of frozen-thawed bovine spermatozoa used in the in vitro fertilization (IVF) of oocytes matured in vitro. 11th Int Congr Anim Reprod AI, 1988(3):339-341.

Marquant-Le Guienne B, Humblot P, Thibier M, Thibault C. Evaluation of bull semen fertility by homologous in vitro fertilization tests. Reprod Nutr Dev 1990; 30:259-265.

Miller DJ, Ax RL. Carbohydrates and fertilization in animals. Molec Reprod Develop 1990; 26:184-198.

Miller DJ, Winer MA, Ax RL. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. Biol Reprod 1990; 42(5-6):899-915.

Nass SJ, Miller DJ, Winer MA, Ax RL. Male accessory sex glands produce heparin-binding proteins that bind to cauda epididymal spermatozoa and are testosterone dependent. Molec Reprod Develop 1990; 25(3):237-246.

Niwa K, Ohgoda O. Synergistic effect of caffeine and heparin on in-vitro fertilization of cattle oocytes matured in culture. Theriogenology 1988; 30(4):733-741.

Ohgoda O, Niwa K, Yuhara M, Takahashi S, Kanoya K. Variations in penetration rates in vitro of bovine follicular oocytes do not reflect conception rates after artificial insemination using frozen semen from different bulls. Theriogenology 1988; 29:1375-1381.

Parrish JJ, Susko-Parrish JL, First NL. Effect of heparin and chondroitin sulfate on the

acrosome reaction and fertility of bovine sperm in vitro. *Theriogenology* 1985a; 24(5):537-549.

Parrish JJ, Parrish JL, First NL. Effect of swim-up separation and heparin pretreatment of frozen-thawed spermatozoa on in vitro fertilization of bovine oocytes. *Biol Reprod* 1984; 30(1):112.

Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH, First NL. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 1986; 25:591-600.

Parrish JJ, Susko-Parrish JL, First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin: inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. *Biol Reprod* 1989; 41:683-699.

Parrish JJ, Susko-Parrish JL, First NL. In vitro fertilization of bovine oocytes using heparin treated and swimup separated frozen thawed bovine semen is repeatable and results in high frequencies of fertilization. *Theriogenology* 1985b; 23:216.

Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Winer MA, First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod* 1988; 38:1171-1180.

Saeki K, Nagao Y, Hoshi M, Nagai M. Effects of heparin, sperm concentration and bull variation on in vitro fertilization of bovine oocytes in a protein-free medium. *Theriogenology* 1995; 43:751-759.

Thérien I, Bleau G, Manjunath P. Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. *Biol Reprod* 1995; 52:1372-1379.

Younis AI, Zuelke KA, Harper KM, Oliveira MAL, Brackett BG. (1991) In vitro fertilization of goats oocytes. *Biol Reprod* 1991; 44:1177-1182.

CAPÍTULO 6

**ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN Y EVOLUCIÓN
DE LOS ESPERMATOZOIDES EN LA FIV**

INTRODUCCIÓN

El éxito de la fecundación *in vitro* depende de la maduración del ovocito y de la capacitación del espermatozoide. El fallo en alguno de estos pasos dará lugar al fracaso de la fecundación. No obstante, la concentración de espermatozoides, el tiempo de interacción de los ovocitos con los espermatozoides, el medio utilizado así como otros muchos factores como la temperatura o el pH pueden interferir en el éxito de la FIV y en el subsiguiente desarrollo de cigotos.

En un sistema de FIV, una de las principales causas de fracaso es la incidencia de poliespermia (5% en el hombre, 10-20% en rumiantes, 50% en el cerdo), mucho más elevada de la que se observa en condiciones naturales (<1%) (revisado por Crozet, 1991b). *In vivo*, muy pocos espermatozoides están presentes cerca de los ovocitos durante la fecundación (Cummins y Yanagimachi, 1982), lo que reduce la posibilidad de polispermia. Por el contrario en la FIV, el gran número de espermatozoides depositados junto a los ovocitos, donde la relación ovocito/espermatozoide oscila normalmente entre 1×10^4 a 1×10^6 , puede dar lugar a un aumento de la poliespermia (Crozet, 1984; 1991a; First y Parrish, 1987). Esta necesidad de inseminar con un gran número de espermatozoides se debe principalmente a que las condiciones *in vitro* no permiten mantener la motilidad de los espermatozoides a baja concentración, así como también se deba probablemente a que los habituales sistemas de capacitación *in vitro* son poco efectivos, obteniéndose un bajo porcentaje de espermatozoides capacitados (revisado por Crozet, 1991b). No obstante, el número de espermatozoides que rodean a los ovocitos capaces de fecundarlos es, a menudo, lo suficientemente alto como para incrementar la probabilidad de que varios espermatozoides penetren la zona pelúcida y membrana plasmática del ovocito, antes de que éste pueda completar el bloqueo de la poliespermia (First y Parrish, 1987).

Por otra parte, los ovocitos incubados con una alta concentración de espermatozoides en un volumen relativamente reducido de medio de fecundación, están expuestos a la acción de los enzimas hidrolíticos liberados por los espermatozoides moribundos o ya muertos (Brackett, 1992), lo que puede tener un efecto perjudicial en su potencial de desarrollo. Por esta misma razón, es generalmente aceptado la necesidad de retirar los ovocitos de la suspensión de espermatozoides muertos o moribundos lo antes posible.

Asimismo, ha sido sugerido que un periodo excesivo de maduración o un prolongado tiempo de incubación con los espermatozoides puede aumentar la incidencia de la poliespermia, debido a que el envejecimiento de los ovocitos reduce su capacidad de bloquearla (Cheng, 1985; Pavlok y col., 1988; Crozet, 1991a), por lo que también el tiempo de interacción de los gametos debe ser controlado. Además, la eficacia para desarrollar este bloqueo es menor en ovocitos madurados *in vitro* que en los madurados *in vivo* (Leibfried-Rutledge y col., 1987).

Sin embargo, las variaciones en la frecuencia de fecundación y desarrollo embrionario debidas a diferentes tiempos del co-cultivo de los gametos pueden ser también, al menos en parte, una manifestación de la heterogeneidad del tiempo requerido por los espermatozoides individualmente para completar la capacitación (Parrish y col., 1988b) o de la necesidad de un tiempo adicional para la consecución de la maduración citoplasmática de los ovocitos. Por lo que el tiempo óptimo de interacción entre los gametos puede variar también en función de la interacción de varios factores como la eficacia del sistema de capacitación y fecundación

e incluso del sistema de maduración *in vitro*, así como las diferencias existentes entre eyaculados y machos.

No obstante, a pesar de haber sido demostrado que existen diferencias individuales entre machos en el tiempo requerido para la capacitación (Parrish y col., 1988b) y por lo tanto para la penetración de los ovocitos, un periodo de co-cultivo de 24 horas proporcionó una frecuencia de penetración y desarrollo pronuclear equivalente para todos los toros (Leibfried-Rutledge y col., 1989). Asimismo, algunos autores sugieren que el co-cultivo de los espermatozoides y los ovocitos durante 24 horas mejora los resultados de división y desarrollo embrionario respecto a tiempos de co-cultivo inferiores (Younis y col., 1991, Rehman y col., 1993). De hecho, en el bovino, el tiempo de co-cultivo de los gametos es de generalmente 18-24 horas (revisado por Greve y Madison, 1991; Brackett y Zuelke, 1993).

Pocos son los estudios realizados sobre los cambios que experimentan los espermatozoides durante la capacitación y reacción acrosómica inducidas *in vitro*, siendo estos procesos valorados generalmente en función de las tasas de penetración obtenidas, lo que puede dar lugar a errores, ya que existen otros muchos factores que influyen en la penetración de los ovocitos. El estudio de la evolución de diferentes parámetros seminales a lo largo del proceso de preparación y FIV, con especial atención a la incidencia de la reacción acrosómica verdadera espontánea, como método de valoración de la capacitación, podría aportarnos una estimable información sobre la eficacia de nuestro sistema de capacitación. Asimismo el estudio comparativo de la incidencia de la reacción acrosómica y la tasa de penetración, obtenidas a diferentes tiempos de co-cultivo, podría verificar la posible existencia de una correlación entre ambos fenómenos.

Aunque la reacción acrosómica puede ocurrir independientemente del ovocito, ha sido demostrado que las envolturas externas del ovocito, cumulus oophorus y zona pelúcida, pueden inducir la reacción acrosómica en los espermatozoides (revisado por Yanagimachi, 1988, 1994). En la especie humana, De Jonge y col. (1988) observaron que la incidencia de la reacción acrosómica aumentaba en presencia de complejos cumulus-ovocito, mientras que Plachot y col. (1984) no observaron este efecto.

Por todo lo anteriormente citado, los objetivos de este trabajo son: 1) determinar la concentración óptima de espermatozoides en el medio de fecundación que asegure altas tasas de división y fecundación normal, con una mínima incidencia de poliespermia u otras anomalías, así como el efecto de las distintas concentraciones sobre la motilidad, vitalidad e integridad acrosómica de los espermatozoides, 2) estudiar la evolución de diferentes parámetros seminales a lo largo del co-cultivo de los gametos y su posible relación con la tasa de penetración y 3) evaluar el efecto de la presencia de los complejos cumulus-ovocito sobre los parámetros seminales, con especial atención al porcentaje de reacción acrosómica verdadera.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizaron 3 experiencias, en cada una de las cuales, el procedimiento anterior a la inseminación de los ovocitos se realizó siguiendo la metodología descrita en el apartado general de material y métodos.

Experiencia 1

En esta experiencia, se estudió el efecto del número de espermatozoides en la gota de FIV. Para ello, los ovocitos obtenidos después de 27 horas de maduración se distribuyeron en 4 grupos y se inseminaron con una concentración aproximada de a) 0.5×10^6 , b) 1×10^6 , c) 2×10^6 y d) 4×10^6 espermatozoides vivos/ml en microgotas de 100 μ l de medio de fecundación. A las 24 horas post-inseminación, los ovocitos se separaron de los espermatozoides y se transfirieron a la monocapa de células de la granulosa, todo ello según la metodología descrita anteriormente. A las 48 horas de la inseminación se evaluó la división de los embriones.

Experiencia 2

A diferencia de la experiencia anterior, todos los ovocitos fueron inseminados con una concentración de aproximadamente 4×10^6 espermatozoides vivos/ml en microgotas de 100 μ l con un total de 14-16 ovocitos/gota.

A continuación, se extrajo un muestra de unos 30 ovocitos aproximadamente a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24 y 28 horas después de la inseminación y se fijaron para la posterior valoración de su estadio nuclear. Coincidiendo con la recogida de muestras de ovocitos, se extrajeron muestras de espermatozoides que habían estado en contacto con los ovocitos.

Experiencia 3

En esta experiencia, grupos de 14-16 ovocitos/gota fueron inseminados con una concentración de aproximadamente 4×10^6 espermatozoides vivos/ml en microgotas de 100 μ l. Paralelamente se incubaron espermatozoides bajo idénticas condiciones, pero sin la presencia de los complejos cumulus-ovocito.

Seguidamente, se extrajeron muestras de espermatozoides de las microgotas con o sin ovocitos a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24 y 28 horas después de la inseminación para evaluar los distintos parámetros seminales.

Valoración de los resultados

Tanto la recogida y procesamiento de las muestras de ovocitos como de espermatozoides, a excepción de estas dos últimas experiencias, se realizaron siguiendo el método descrito en el apartado general de material y métodos. Además del tratamiento estadístico descrito en el mismo apartado, se realizaron diferentes correlaciones entre los parámetros obtenidos, utilizando el mismo programa estadístico que en los anteriores análisis.

RESULTADOS

Experiencia 1

Motilidad, vitalidad y estado acrosomal

Los resultados referentes a las parámetros seminales estudiadas en esta experiencia se muestran en la tabla 1, no observándose diferencias significativas entre tratamientos en

ninguno de los parámetros valorados a las 17 horas de la inseminación.

Tabla 1: Parámetros seminales¹ (\pm ES) a las 17 h. post-inseminación según la concentración de espermatozoides en la gota de fecundación.

	CONCENTRACIÓN ESPERMATOZOIDES VIVOS ($\times 10^6$ /ml)			
	0.5	1	2	4
%móviles	46 \pm 6	55 \pm 4	55 \pm 4	58 \pm 4
%vivos	35,6 \pm 3,1	52,1 \pm 2,0	30,8 \pm 2,0	39,8 \pm 2,0
%acrosomas intactos	62,2 \pm 4,2	79,9 \pm 2,7	65,8 \pm 2,7	69,8 \pm 2,7
%vivos sin acrosoma	0,0 \pm 0,4	1,1 \pm 0,3	0,3 \pm 0,3	0,3 \pm 0,3

¹: valores LSMeans

ES: error estándar de la LSMeans

Tasas de penetración y división

El número de espermatozoides vivos introducidos en las gotas de fecundación en los distintos tratamientos (a: 0.5×10^6 , b: 1×10^6 , c: 2×10^6 y d: 4×10^6) no afectó significativamente al porcentaje de ovocitos normalmente fecundados, aunque éste aumentaba a medida que la concentración era mayor. Tanto la tasa de penetración total como la incidencia de poliespermia fue significativamente superior al utilizar concentraciones $\geq 2 \times 10^6$ de espermatozoides vivos/ml (Tabla 2).

La tasa de división total y el porcentaje de embriones de 2 células, valorados a las 48 horas de la inseminación, fue también superior ($p=0.001$) cuando la concentración de espermatozoides vivos era igual o mayor a 2×10^6 . El porcentaje de embriones que superaron el estadio de 2 células fue significativamente superior en el grupo de ovocitos que fueron inseminados con una concentración de 4×10^6 e inferior en los que se inseminaron con 0.5×10^6 de espermatozoides/ml, mientras que los que fueron inseminados con las concentraciones intermedias no difirieron entre sí, presentando valores que diferían de los de los otros dos tratamientos.

Tabla 2: Efecto de distintas concentraciones de espermatozoides vivos en la gota de fecundación sobre la tasa de penetración y división de los ovocitos¹ (n° de réplicas= 4).

Concentración espermatoz. vivos (x10 ⁶ /ml)	17 horas post-inseminación % ovocitos penetrados (n°)					48 horas post-inseminación % embriones (n°)			
	n°	Total	2PN	PS	Anorm	n°	2 cel	>2 cel	Total División
0.5	57	7,0 ^a (4)	3,5 (2)	1,8 ^a (1)	1,8 (1)	191	1,1 ^a (2)	0,0 ^a (0)	1,1 ^a (2)
1	64	9,4 ^a (6)	6,3 (4)	1,6 ^a (1)	1,6 (1)	217	1,8 ^a (4)	3,7 ^b (8)	5,5 ^a (12)
2	74	28,4 ^b (21)	9,5 (7)	12,2 ^b (9)	6,8 (5)	200	11,0 ^b (22)	5,5 ^b (11)	16,5 ^b (33)
4	83	43,4 ^b (36)	15,7 (13)	15,6 ^b (13)	12,1 (10)	219	16,4 ^b (36)	12,3 ^c (27)	28,8 ^b (63)

Ovocitos penetrados: 2PN= 2 pronúcleos + cola del espermatozoide, PS= poliespérmicos, Anorm= fecundados de forma anormal.

Embriones: 2cel= embriones de 2 células, >2cel= embriones de más de 2 células.

a,b,c: diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas p<0.05.

¹: valores expresados como frecuencia.

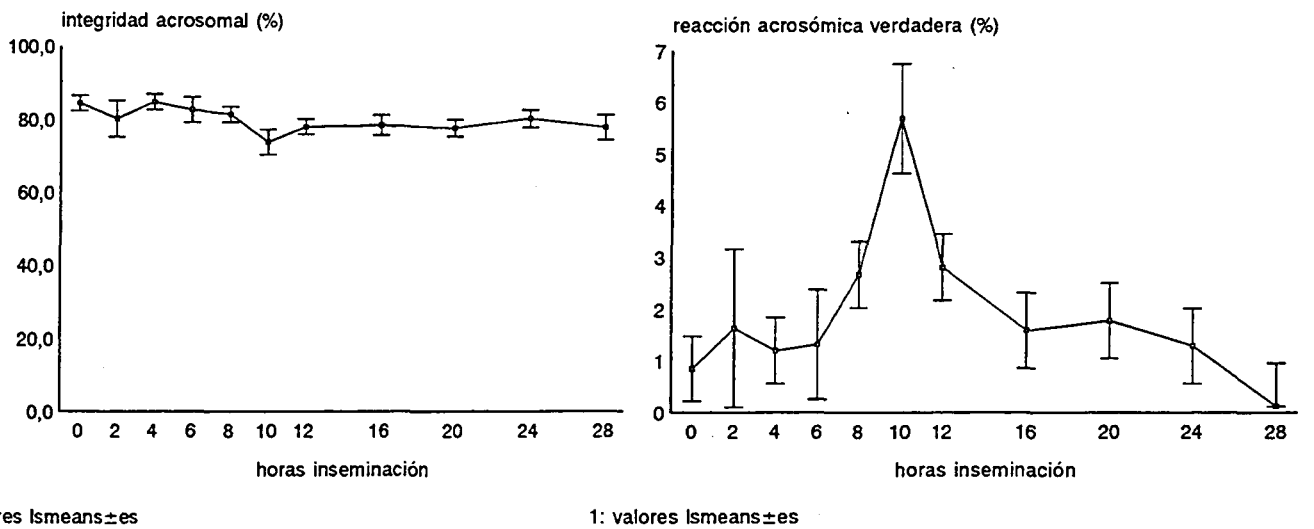
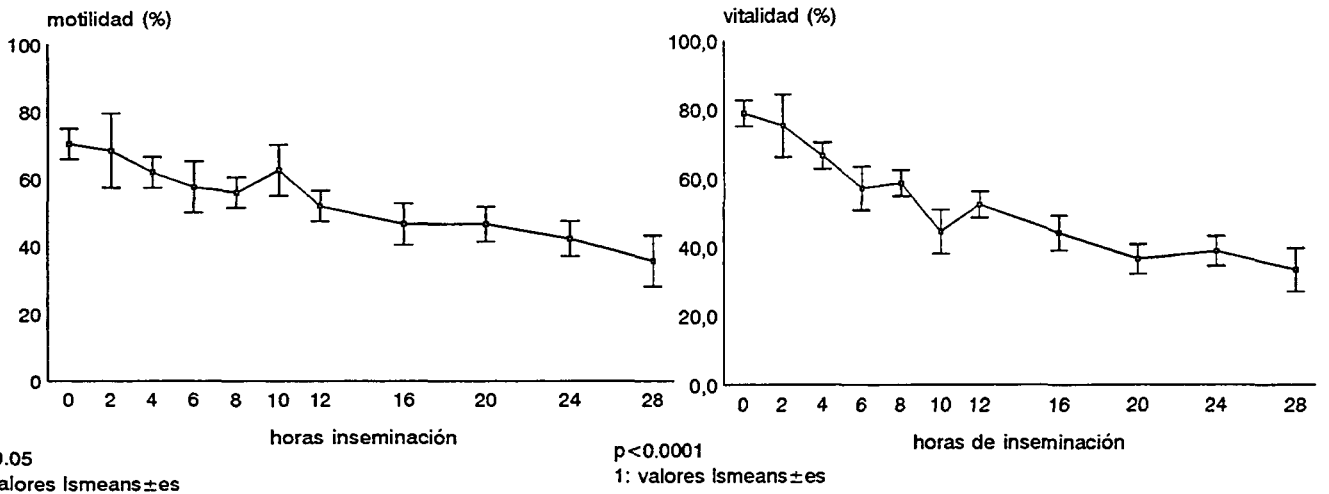
Experiencia 2

Motilidad, vitalidad y estado acrosomal

Los resultados referentes a los parámetros seminales estudiadas en esta experiencia se muestran en la figura 1.

Al comparar los resultados obtenidos después de los diferentes tiempos de inseminación, se observa como los valores de motilidad, vitalidad e integridad acrosomal disminuyen con el tiempo presentando diferencias significativas, a excepción del porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal que no difirió estadísticamente (p=0.11). Al correlacionar los parámetros seminales anteriores con el tiempo, se observaron coeficientes de correlación negativos tanto con el porcentaje de motilidad (R=-0.55, p<0.001), con el de vitalidad (R=-0.77, p<0.0001) e incluso con el porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto (R=-0.49, p<0.005), lo que confirma el efecto perjudicial de la duración del co-cultivo sobre los espermatozoides. Por otra parte, al intentar correlacionar cada uno de estos parámetros con las tasas de penetración obtenidas en los distintos tiempos de inseminación no se obtuvo ninguna correlación significativa.

Figura 1: Evolución del porcentaje de (a) motilidad, (b) vitalidad, (c) integridad del acrosoma y (d) reacción acrosómica verdadera de los espermatozoides durante el co-cultivo con los ovocitos.



La evolución de las distintas categorías de espermatozoides obtenidas mediante la Triple Tinción, después de diferentes tiempos de co-cultivo con los ovocitos, se muestra en la figura 2. Al analizar estos resultados, sólo se observó un efecto significativo ($p < 0.0001$) del tiempo de co-cultivo en los porcentajes de espermatozoides vivos con acrosomas y muertos con acrosoma, mientras que el resto de categorías no se vieron significativamente afectadas. No obstante, el porcentaje de espermatozoides muertos sin acrosoma aumenta de valores próximos al 15% en las primeras 8 horas del co-cultivo a valores más cercanos o incluso superiores al 20% en las horas siguientes, aunque no significativamente. Asimismo, a pesar de que el efecto del tiempo tampoco fue significativo ($p = 0.0573$) en el porcentaje de espermatozoides vivos reaccionados, se pudo observar una mayor incidencia de reacción acrosómica verdadera espontánea entre las 8 y 12 horas de la inseminación, con un máximo del 5.7% en los espermatozoides que habían estado en contacto con los ovocitos durante 10 horas, aunque tampoco se encontró una correlación significativa entre la incidencia de este parámetro seminal y las tasas de penetración.

Tasa de penetración

En la figura 3 se muestra la evolución de la de la tasa de penetración de los ovocitos.

La primera evidencia de penetración de los ovocitos (12,7%) fue observada a las 4 horas de la inseminación. La tasa de penetración incrementó hasta valores próximos y/o superiores al 30% (37,2% a las 12 horas), aunque a partir de las 6 horas de co-cultivo de los gametos las diferencias observadas ya no eran estadísticamente significativas.

Experiencia 3

Los resultados obtenidos en esta experiencia se muestran en la figura 4.

Al analizar los resultados obtenidos, no se observó ninguna interacción significativa entre el tiempo y la presencia o ausencia de los complejos cumulus-ovocito sobre la motilidad, vitalidad y porcentaje de acrosomas intactos.

No obstante, se observó un efecto positivo de la presencia de los complejos cumulus-ovocito sobre la vitalidad e integridad acrosomal de los espermatozoides incubados ($p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente), mientras que el porcentaje de espermatozoides móviles fue mayor significativamente ($p < 0.05$) en ausencia de estos complejos.

Tampoco se observó una interacción significativa entre el tiempo y la presencia de complejos cumulus-ovocito en el porcentaje de espermatozoides vivos reaccionados. Así como tampoco se observó un efecto significativo de la presencia o ausencia de los complejos sobre este mismo parámetro, a pesar de que la incidencia de reacción acrosómica verdadera fue superior en presencia de los complejos cumulus-ovocito. De la misma forma que en la experiencia anterior, tampoco se observó un efecto significativo del tiempo de incubación de los espermatozoides ($p = 0.0502$) sobre el porcentaje de espermatozoides vivos reaccionados, presentando en ambas experiencias una evolución a lo largo del tiempo muy similar.

Figura 2: Evolución de las distintas categorías de espermatozoides obtenidas mediante la Triple Tinción durante el co-cultivo con los ovocitos.

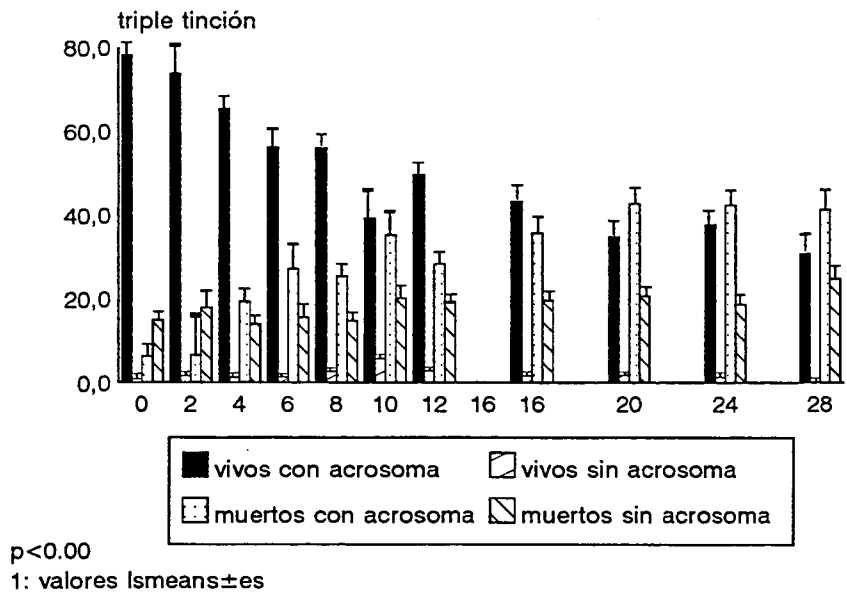
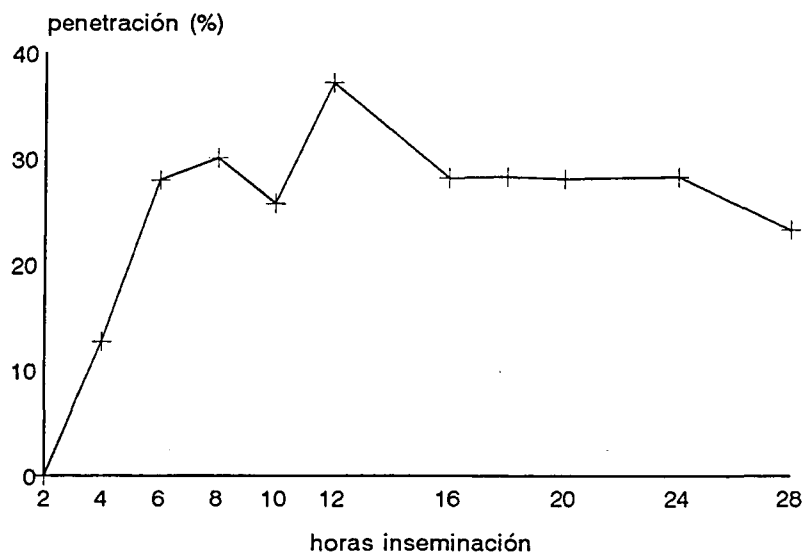
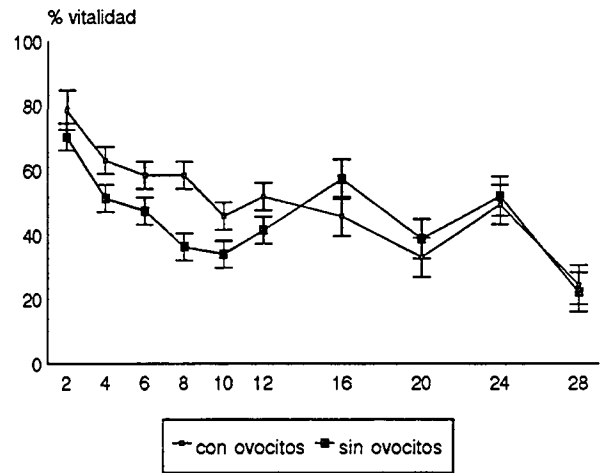
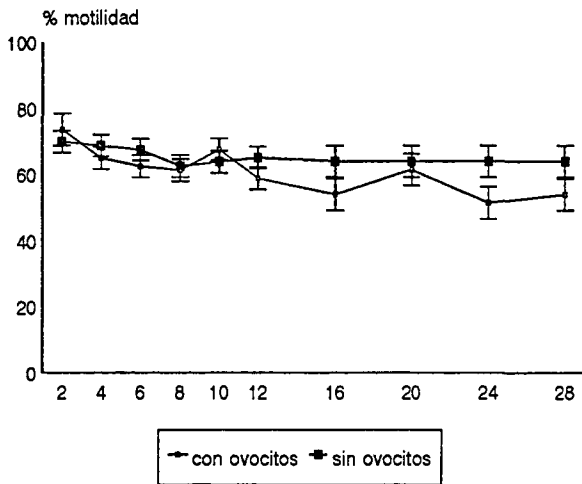


Figura 3: Evolución de la tasa de penetración de los ovocitos a lo largo del co-cultivo.



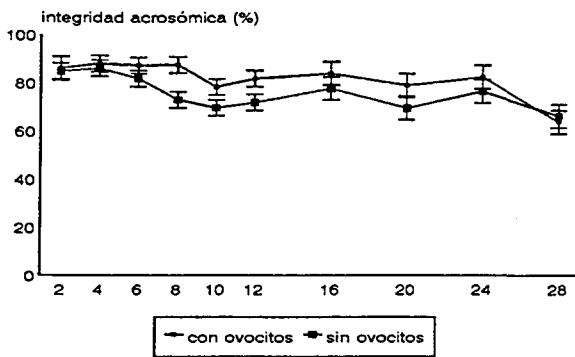
1: valores expresados en frecuencias

Figura 4: Efecto de la presencia de complejos cumulus-ovocito sobre la evolución del porcentaje de (a) motilidad, (b) vitalidad, (c) integridad del acrosoma y (d) reacción acrosómica verdadera de los espermatozoides.

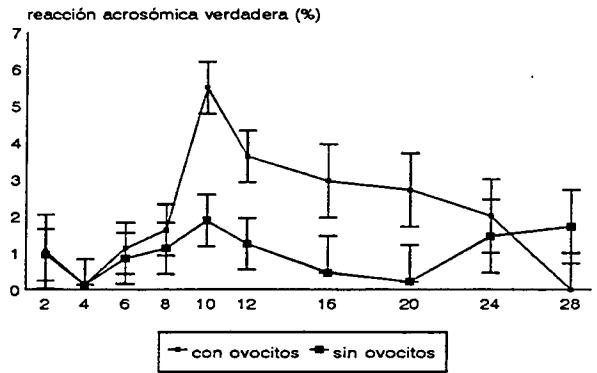


p<0.05
1: valores \pm es

p<0.05
1: valores \pm es



p<0.01
1: valores \pm es



1: valores \pm es

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo, después de comparar distintas concentraciones de espermatozoides en el medio de fecundación, indican que al aumentar la concentración espermática se incrementa la incidencia de la poliespermia, así como la tasa de penetración total, sin afectar significativamente al porcentaje de fecundación normal. No obstante, la tasa de división de los ovocitos también se vio incrementada significativamente a medida que la concentración espermática aumentaba. Estos resultados podrían indicar que una parte de los ovocitos que no se fecundaron normalmente serían capaces de dividirse. Un efecto similar ha sido descrito por Long y col.(1993) en ovocitos bovinos, quienes sugieren que algunos de los blastocistos obtenidos podían proceder de ovocitos poliploides, androgénicos o que habían sido capaces de eliminar los espermatozoides accesorios.

Por el contrario, Ling y Lu (1990), a pesar de no observar diferencias significativas en la tasa de división con diferentes concentraciones de espermatozoides (0.64 , 1.6 , 3.2 y 4.8×10^6), observaron un descenso en el número de blastocistos bovinos cuando la concentración excedía de 1.6×10^6 espermatozoides, sugiriendo que los ovocitos poliespérmicos que se habían dividido no fueron capaces de desarrollarse hasta el estadio de blastocisto. De hecho, Iwasaki y col. (1989) observaron que el número de embriones con anomalías cromosómicas parecía disminuir a medida que el desarrollo embrionario progresaba, debido a que los embriones con complementos cromosómicos erróneos detenían su desarrollo.

En nuestros resultados, el incremento en el número de espermatozoides vivos introducidos en las gotas de fecundación, a pesar de la ausencia de un efecto estadísticamente significativo, produjo un aumento progresivo en la formación de los 2 pronúcleos. De la misma manera, también se observó un incremento en el porcentaje de ovocitos penetrados anormalmente, por lo que el efecto significativo de la concentración espermática observado en el porcentaje total de penetración no parece deberse exclusivamente al aumento significativo de la incidencia de la poliespermia. Al intentar reducir la aparición de ovocitos poliespérmicos disminuyendo el número de espermatozoides, no sólo no se ha mejorado el porcentaje de fecundación normal, sino que incluso se ha reducido.

En trabajos preliminares (Palomo y col.,1995), con mayores diferencias entre las concentraciones de espermatozoides utilizadas, al reducir la concentración de 10 a 5×10^6 de espermatozoides/ml, el porcentaje de penetración normal aumentó en más del doble y la incidencia de poliespermia se redujo significativamente casi a una cuarta parte, sin afectar la tasa de penetración y división. Mientras que al reducir la concentración de 5 a 2×10^6 de espermatozoides/ml, los valores de penetración total, fecundación normal y poliespermia obtenidos fueron muy similares en ambos casos, aunque la tasa de división se redujo significativamente al inseminar con 2×10^6 de espermatozoides/ml. Estos resultados preliminares, junto a los aquí presentados, sugieren que, a partir de una determinada concentración espermática, el incremento en el número de espermatozoides afecta negativamente al porcentaje de fecundación normal, además de aumentar la incidencia de poliespermia.

Numerosos esfuerzos han sido realizados para reducir la poliespermia en los sistemas de FIV, ya que es la anomalía de la fecundación más frecuente en la mayoría de especies (Saeki y col., 1991). Sin embargo, todavía no se ha podido determinar con exactitud la concentración

óptima en cada especie y para cada sistema de FIV. Concretamente en el caprino, la concentración en el medio de FIV más comúnmente utilizada en los distintos laboratorios ha sido la de 1×10^6 de espermatozoides/ml (Younis y col., 1991; Jufen y col., 1991; Martino y col., 1994, De Smedt y col., 1992; Cox y col., 1994), aunque también han sido utilizadas concentraciones de 2×10^6 (Pawshe y col., 1994), $0.2-2.5 \times 10^6$ en espermatozoides epididimarios (Song e Iritani, 1988) e incluso concentraciones de hasta 2×10^7 (Chauhan y Anand, 1991).

En el presente trabajo, al comparar concentraciones de 0.5, 1, 2 y 4×10^6 de espermatozoides vivos en la gota de FIV, los resultados obtenidos indican que, en nuestras condiciones, la concentración óptima parece ser la de 4×10^6 , ya que es la que nos proporcionó las mayores tasas de penetración total, fecundación normal y división total, a pesar de no diferir significativamente de las obtenidas con la concentración inmediatamente inferior (2×10^6). Tampoco se observaron diferencias en el porcentaje de poliespermia (12.2% y 15.6% para 2 y 4×10^6 , respectivamente), presentando valores inferiores a los obtenidos por De Smedt y col. (1992) en ovocitos de cabras adultas (20%) con una concentración de 1×10^6 . En cambio, el porcentaje de ovocitos que superaron el estadio de 2 células fue significativamente superior cuando se utilizó una concentración de 4×10^6 . Esta concentración es bastante superior a la utilizada por la mayoría de los grupos que trabajan en caprino (De Smedt y col., 1992; Cox y col., 1994; Younis y col., 1991). Los resultados obtenidos en nuestras condiciones muestran la necesidad de cuadruplicar (o incluso más) la concentración utilizada por estos autores para poder obtener resultados comparables, teniendo siempre en cuenta que en nuestro caso utilizamos ovocitos procedentes de animales prepúberes. Aunque desconocemos las causas, parece probable que nuestro sistema de capacitación y fecundación *in vitro* no sea tan efectivo como el del resto de equipos, lo que podría explicar la necesidad de inseminar con una mayor concentración de espermatozoides para así proporcionar un número suficiente de espermatozoides correctamente capacitados y capaces de fecundar un porcentaje aceptable de ovocitos (Crozet, 1991b).

Al comparar la concentración de 1×10^6 de espermatozoides/ml con la de 4×10^6 en el presente trabajo, los resultados obtenidos con 4×10^6 fueron superiores significativamente tanto en el porcentaje de penetración total (43.4% vs 9.4%) como en el de división total (28.8% vs 5.5%), lo que demuestra que en nuestras condiciones una concentración de 1×10^6 es insuficiente. Como ya describieron First y Parrish (1987), si la capacitación no es eficiente, muy pocos espermatozoides serán capaces de fecundar ovocitos y la poliespermia no será un problema, como se ha podido observar en nuestro caso al utilizar concentraciones de $\leq 1 \times 10^6$ (1.8% y 1.6% para 0.5 y 1×10^6 , respectivamente).

También ha sido descrito que la dilución de los espermatozoides provoca una rápida pérdida de la motilidad y por lo tanto de su poder fecundante. Sin embargo, al valorar las características seminales tras 17 horas de co-cultivo, no se observó ningún efecto significativo de la dilución realizada en cada tratamiento sobre la motilidad de los espermatozoides ni sobre el resto de parámetros valorados. Por lo que las bajas tasas de fecundación obtenidas con las concentraciones inferiores (0.5 y 1×10^6) no parecen deberse a la dilución a la que han sido sometidos los espermatozoides, sino a la eficacia del sistema de capacitación.

La utilización de altas concentraciones de espermatozoides puede dar lugar a un descenso en las tasas de fecundación, debido muy probablemente a la exposición de los gametos a metabolitos y/o productos degenerativos de los espermatozoides (Saeki y col., 1995). Sin

embargo, en el presente trabajo, este efecto perjudicial no ha sido apreciado. Tampoco se han observado diferencias significativas entre las distintas concentraciones utilizadas respecto a los parámetros seminales valorados después de 17 horas de co-cultivo, lo que parece indicar que la concentración de 4×10^6 espermatozoides/ml no es excesivamente alta para provocar un efecto perjudicial en los gametos.

En el presente trabajo, el porcentaje máximo de penetración (37.2%) se obtuvo a las 12 horas de la inseminación, aunque el tiempo mínimo de co-cultivo en el que se pudo observar ovocitos fecundados (12,7%) fue de 4 horas, no observándose diferencias significativas en la penetración entre la máxima obtenida con 12 horas de co-cultivo y tiempos de inseminación de entre 6 y 28 horas.

En el ovino, Cheng (1985) observó las primeras penetraciones a las 2 horas post-inseminación, mientras que Crozet (1988), con ovocitos ovulados, observó penetración con un tiempo de co-cultivo inferior a 2 horas. En el bovino, Saeki y col. (1991) describen la necesidad de un tiempo mínimo de 3 horas para que se observe la penetración de los ovocitos. No obstante, también en el bovino se han descrito tiempos superiores como 6 (Xu y Greve, 1988) y 8 horas (Hyttel y col., 1988), lo que parece reflejar diferencias en la eficacia del sistema de capacitación. Asimismo, estas diferencias podrían influir en el tiempo necesario para obtener el máximo porcentaje de penetración. De hecho, Xu y Greve (1988) obtuvieron la máxima tasa de penetración en ovocitos bovinos con un periodo de 28 horas, mientras que Saeki y col. (1991) la obtuvieron con 5 horas de co-cultivo. En el ovino, Cheng (1985) obtuvo la máxima tasa de penetración entre 6-8 horas. También en el caprino, la mayor tasa de penetración ha sido observada a las 6 horas de la incubación (Cox y col., 1995).

Respecto a la evolución de los primeros estadios de desarrollo *in vitro* de los ovocitos penetrados de cabras prepúberes madurados y fecundados *in vitro*, Mogas (1994) concluyó que la descondensación de la cabeza del espermatozoide y de la cromatina femenina se iniciaba entre las 6 y las 8 horas de la inseminación y que el tiempo requerido para que se completase la formación de los pronúcleos en la mayoría de ovocitos era de 4 a 8 horas más. Asimismo, observó que las anomalías más frecuentes durante la fecundación fueron la poliespermia, la poliginia y la asincronía entre el desarrollo de los pronúcleos masculino y femenino, debido principalmente a una falta de descondensación de la cabeza del espermatozoide.

Aunque el mantenimiento de la motilidad de los espermatozoides a altos niveles durante la capacitación y tiempo de co-cultivo ha sido considerado un factor de extrema importancia en el éxito de la fecundación *in vitro* (Cheng, 1985), en el presente trabajo no ha sido posible encontrar una correlación entre el porcentaje de espermatozoides móviles, ni entre el resto de parámetros seminales valorados al final de los diferentes periodos de co-cultivo, con las tasas de penetración de los ovocitos. Este resultado puede deberse probablemente a que tanto la motilidad de los espermatozoides como la vitalidad e integridad acrosómica a lo largo de la inseminación se han mantenido dentro de un rango aceptable sin llegar a comprometer el éxito de la fecundación, a pesar de que estos parámetros seminales han ido disminuyendo a lo largo del tiempo.

Los estadios finales de la capacitación y la inducción de la reacción acrosómica no son alcanzados generalmente hasta transcurridas algunas horas después de la introducción de los

espermatozoides en el medio de fecundación. Desafortunadamente en el caprino, no conocemos el tiempo exacto requerido por el espermatozoide para alcanzar dichos estados ni el tiempo necesario para penetrar las envolturas del cumulus y la zona pelúcida, y fusionarse con el ovocito, así como tampoco la proporción de espermatozoides que serán capaces de fecundar ovocitos. No obstante, podemos afirmar que, en nuestras condiciones, al menos una población de los espermatozoides puestos en contacto con los ovocitos han sido capaces de experimentar todos estos fenómenos entre 2 y 4 horas de co-cultivo. De hecho, Parrish y col. (1988a) demostraron que la capacitación inducida por heparina en espermatozoides bovinos requería un mínimo de 4 horas de exposición a la heparina para que los cambios de la membrana plasmática previos a la reacción acrosómica fueran detectados.

Concretamente en el ovino, Crozet (1988) observó, en ovocitos ovulados y fecundados *in vitro*, varios espermatozoides con el acrosoma reaccionado unidos a la superficie de la zona pelúcida, e incluso alguno que ya estaba penetrándola, a las 1.25 horas post-inseminación. En cambio, Hyttel y col. (1988) no observaron espermatozoides sufriendo la reacción acrosómica en la superficie de ovocitos bovinos madurados y fecundados *in vitro* hasta transcurridas 6 horas de la inseminación. A diferencia de estos autores, en el presente trabajo no se ha realizado un estudio ultraestructural de la fecundación *in vitro*, por lo que desconocemos el tiempo exacto en que los espermatozoides sufrieron la reacción acrosómica en la superficie de la zona pelúcida de los ovocitos antes de ser penetrados.

Sin embargo, se ha estudiado la evolución de la inducción de la reacción acrosómica espontánea en los espermatozoides que permanecieron en el medio de FIV, después de retirar los ovocitos a diferentes tiempos. Este estudio permitió observar un incremento en este parámetro con el tiempo, hasta alcanzar el valor máximo a las 10 horas de la inseminación, pero disminuyendo posteriormente hasta obtener a las 28 horas valores inferiores incluso a los presentados en el inicio del co-cultivo. En el bovino, Fukui (1990) observó que la proporción de espermatozoides vivos reaccionados aumentaba significativamente a las 3 horas del inicio de la inseminación de los complejos cumulus-ovocito, obteniendo el valor máximo de reacción acrosómica verdadera a las 6 horas, porcentaje que fue disminuyendo en las posteriores observaciones realizadas. Una evolución similar de la reacción acrosómica verdadera se obtuvo durante la incubación en ausencia de ovocitos de espermatozoides eyaculados de morueco (Garde y col., 1992) y de espermatozoides de la cola del epidídimo de ciervo (*Cervus elaphus*) (Aguado y col., 1994), obteniendo los porcentajes máximos a las 6 horas y a las 6-9 horas, respectivamente. También en la especie humana, se ha demostrado un incremento en el porcentaje de espermatozoides vivos reaccionados durante las primeras 6 horas de incubación, presentando valores similares durante las siguientes 6 horas (Talbot y Chacon, 1981).

El retraso observado en nuestro trabajo, respecto a estos autores, en la aparición del porcentaje máximo de espermatozoides vivos reaccionados podría deberse, a parte de las diferencias existentes entre especies, a que la capacitación inducida por heparina es retrasada por el efecto de la glucosa añadida en el medio (Parrish y col., 1989). Parrish y col. (1989) demostraron que la capacitación de espermatozoides bovinos requería periodos de incubación largos (12 horas) en presencia de heparina y glucosa, lo que podría explicar, al menos en parte, que la máxima incidencia de reacción acrosómica, en nuestro trabajo, se obtuviera a las 8-12 horas de la inseminación. Sin embargo, Fukui (1990), quien también utilizó heparina (100 µg/ml) en presencia de glucosa para inducir la capacitación, no observó este retraso. No obstante,

este autor también sugirió que la presencia de glucosa en el medio podía ser la responsable de las bajas tasas de reacción acrosómica obtenidas en su trabajo, indicando que para obtener resultados satisfactorios en la FIV, cuando la glucosa está presente en el medio, se requeriría una concentración superior de heparina. Esta sugerencia podría explicar no sólo los bajos porcentajes de reacción acrosómica obtenidos en nuestro trabajo, sino también el retraso observado en la aparición del porcentaje máximo, ya que en nuestras condiciones la concentración de heparina utilizada fue de 50 µg/ml. Sin embargo, a pesar de haber utilizado en el trabajo anterior la misma concentración de heparina (100 µg/ml) que la utilizada por Fukui (1990), no podemos confirmar la existencia de este retraso, ya que la incidencia de la reacción acrosómica sólo se evaluó al inicio y al final del co-cultivo.

En el presente trabajo no ha sido posible correlacionar los resultados de reacción acrosómica verdadera con la tasa de penetración, lo que parece sugerir o bien que la incidencia de la reacción acrosómica no es un parámetro útil para predecir la capacidad fecundante de la muestra de espermatozoides o que el número de experiencias realizadas ha sido insuficiente para obtener dicha correlación. No obstante, el hecho de que haya sido observado el porcentaje máximo de penetración de los ovocitos a las 12 horas de la inseminación y que la mayor incidencia de reacción acrosómica se consiga entre las 8-12 horas, podría indicar una cierta relación entre ambos fenómenos. Fukui (1990) observó que el incremento significativo en el porcentaje de espermatozoides vivos reaccionados entre las 3 y 6 horas de la inseminación coincidía con la penetración del ovocito por parte del espermatozoide. Sin embargo, Plachot y col. (1984) y De Jonge y col. (1988) sugieren que no existe correlación entre los resultados de FIV y el porcentaje de espermatozoides vivos reaccionados que nadaban libremente en el medio de fecundación, aunque estos autores valoraron la incidencia de reacción acrosómica al final y no a lo largo del co-cultivo de los gametos.

Por otra parte, se ha sugerido que las subpoblaciones de espermatozoides sufren un ciclo continuo de evolución que consistiría en espermatozoide no capacitado-capacitado-reacción acrosómica verdadera-muerte celular (Didion y col., 1989). De hecho, varios autores han descrito que la muerte espermática sobreviene rápidamente después de haber sufrido la reacción acrosómica (Fleming y Yanagimachi, 1982; Bedford, 1983, citados por Didion y col., 1989). En el presente trabajo, al estudiar la evolución de las distintas categorías a lo largo del co-cultivo se observa que a medida que el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto disminuye, el de espermatozoides muertos con acrosoma también intacto aumenta, ambos significativamente. Por el contrario, la proporción de espermatozoides reaccionados tanto vivos como muertos no se ve afectada significativamente. Esto podría ser debido a que, en nuestras condiciones, la población de espermatozoides vivos reaccionados es tan pequeña que cuando éstos mueren rápidamente después de haber sufrido la reacción acrosómica, el porcentaje de espermatozoides muertos reaccionados apenas se ve afectado. No obstante, el hecho de que los porcentajes de espermatozoides muertos reaccionados aumenten a valores próximos o superiores al 20% a partir de las 10 horas de co-cultivo coincidiendo con la máxima incidencia de reacción acrosómica, parece confirmar que en nuestras condiciones este ciclo de evolución descrito por Didion y col. (1989) también existe, a pesar de no ser estadísticamente significativo.

En relación al papel de los complejos cumulus-ovocito en la reacción acrosómica de los espermatozoides, nuestros resultados, a pesar de no mostrar un efecto significativo, parecen indicar que la presencia de estos complejos incrementa la incidencia de reacción acrosómica

en los espermatozoides que nadan libres en el medio. Fukui (1990) indica que las células del cumulus son necesarias para maximizar la incidencia de reacción acrosómica en espermatozoides congelados bovinos, al comparar los resultados obtenidos en presencia de complejos cumulus-ovocito con los obtenidos en presencia de ovocitos desnudos. También en la especie humana, De Jonge y col. (1988) observaron porcentajes superiores de espermatozoides vivos reaccionados cuando eran incubados en presencia de los complejos cumulus-ovocito que en su ausencia, mientras que Plachot y col. (1984) no observaron diferencias. No obstante hay que tener en cuenta que ambos equipos observaron la incidencia de la reacción acrosómica al final del co-cultivo de los gametos (16-17 horas), y no a lo largo de éste. Asimismo, De Jonge y col. (1988) sugirieron que los componentes celulares que inducen la reacción acrosómica están asociados a todos los ovocitos, independientemente de su madurez y capacidad de ser fecundados.

En conclusión, bajo nuestras condiciones, la concentración óptima en la gota de FIV es de 4×10^6 de espermatozoides/ml ya que es la que nos proporciona el mayor porcentaje de penetración total y normal, con un aceptable nivel de poliespermia, así como también la mayor tasa de división total y el máximo porcentaje de embriones que han superado el estadio de 2 células. Respecto a la cinética de la reacción acrosómica en el presente trabajo, se observa un incremento en la incidencia de espermatozoides vivos reaccionados entre las 8-12 horas de la inseminación, aunque no se ha podido encontrar una correlación significativa entre este parámetro seminal y la tasa de penetración. Asimismo, la presencia de los complejos cumulus-ovocito parece favorecer la reacción acrosómica verdadera de los espermatozoides que nadan libremente en el medio de FIV, no observándose en nuestro caso un efecto significativo.

BIBLIOGRAFÍA

Aguado MJ, Madridano JM, Gracia O, Gallego R, Ayllón E, Garde, JJ. Proc 7ª Jornadas Int Reprod Anim, Murcia,1994:109.

Bedford JM. Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals. Biol Reprod 1983; 28:108-120.

Brackett BG, Zuelke, KA. Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos. Theriogenology 1993; 39:43-64.

Cox JF, Avila J, Saravia F, Santa María A. Assessment of fertilizing ability of goat spermatozoa by in vitro fertilization of cattle and sheep intact oocytes. Theriogenology 1994; 41:1621-1629.

Cox JF, Saravia F, Briones M, Santa María A. Dose-dependent effect of heparin on fertilizing ability of goat spermatozoa. Theriogenology 1995; 44(3):451-460.

Crozet N. Ultrastructural aspects of in vitro fertilization in the cow. Gamete Res 1984; 10:241-251.

Crozet N. Manipulation of oocytes and in vitro fertilization. J Reprod Fert 1991a;Suppl 43:235-243.

- Crozet N. Fine structure of sheep fertilization in vitro *Gamete Res* 1988; 19:291-303.
- Crozet N. La fécondation in vivo et in vitro En: Thibault C, Levasseur MC. (eds) *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. INRA-Éditions Marketing, Paris, 1991b:315-337.
- Cummins JM, Yanagimachi R. Sperm-egg ratios and the site of the acrosome reaction during in vivo fertilization in the hamster. *Gamete Res* 1982; 5:239-256.
- Chauhan MS, Anand SR. In vitro maturation and fertilization of goat oocytes. *Indian J Exp Biol* 1991; 29:105-110.
- Cheng WTK. In vitro fertilization of farm animal oocytes. PhD Thesis, University of Cambridge, 1985:133-154
- De Jonge CJ, Rawlins RG, Zaneveld LJD. Induction of the human sperm acrosome by human oocytes. *Fertil Steril* 1988; 50(6):949-953.
- De Smedt V, Crozet N, Ahmed-Ali M, Martino A, Cognié Y. In vitro maturation and fertilization of goat oocytes *Theriogenology* 1992; 37:1049-1060.
- Didion BA, Dobrinsky JR, Giles JR, Graves CN. Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. *Gamete Res* 1989; 22:51-57.
- First NL, Parrish JJ. In-vitro fertilization of ruminants *J Reprod Fert* 1987; Suppl 34:151-165.
- Fleming AD, Yanagimachi R. Fertile life of acrosome-reacted guinea-pig spermatozoa. *J Exp Zool* 1982; 220:109-115.
- Fukui Y. Effect of follicle cells on the acrosome reaction, fertilization, and developmental competence of bovine oocytes matured in vitro. *Molecular Reprod Develop* 1990; 26:40-46.
- Garde J, García Artiga C, Gutiérrez A, Vázquez I. Triple tinción para valorar acrosomas normales y viabilidad espermática en semen ovino. *Med Vet* 1992; 9(2):107-113.
- Greve T, Madison V. In vitro fertilization in cattle:a review. *Reprod Nutr Dev* 1991; 31:147-157.
- Hyttel P, Xu KP, Greve T. Ultrastructural abnormalities of in vitro fertilization of in vitro matured bovine oocytes. *Anat Embryol* 1988; 178:47-52.
- Iwasaki S, Shioya Y, Masuda A, Hanada A, Nakahara T. Incidence of chromosomal anomalies in early bovine embryos derived from in vitro fertilization. *Gamete Res* 1989; 22:83-91.
- Jufen Q, Zhiming H, Yong Z, Jianchen W. In vitro capacitation of ejaculated spermatozoa and in vitro fertilization in dairy goats. *Theriogenology* 1991; 35(1):219.

Leibfried-Rutledge ML, Crister ES, Eyestone WH, Northey DL, First NL. Development potential of bovine oocytes matured in vitro or in vivo. *Biol Reprod* 1987; 36:376-383.

Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Parrish JJ, First NL. In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 1989; 31:61-73.

Ling ZJ, Lu KH. Frequency of cleavage and development in vitro of bovine oocytes fertilized in different numbers in drops with different concentration. *Theriogenology* 1991; 33:257.

Long CR, Chase CN, Balise JJ, Duby RT, Robl JM. Effect of sperm removal time, sperm concentration and motility enhancers on fertilization parameters and development of bovine embryos in vitro. *Theriogenology* 1993; 39:261.

Lu KH, Shi DS, Jiang HS, Goulding D, Boland MP, Roche JF. Comparison of the development capacity of bovine oocytes from superovulated and non stimulated heifers. *Theriogenology* 1991; 35:234.

Martino A, Palomo MJ, Mogas T, Paramio MT. Influence of the collection technique of prepubertal goat oocytes on in vitro maturation and fertilization. *Theriogenology* 1994; 42:859-873.

Mogas T. Producció in vitro d'embrions pre-implantacionals en el cabrum. Tesis Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona, 1994.

Palomo MJ, Mogas T, Izquierdo MD, Paramio MT. Effect of heparin and sperm concentration on IVF of prepubertal goat oocytes *Theriogenology* 1995; 43(1):292.

Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Critser ES, Leibfried-Rutledge ML, Barnes F, Eyestone WH, First NL. Bovine in vivo fertilization 11th *Tech AI and Reprod*, 1988b:120.

Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Winer MA, First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod* 1988a; 38:1171-1180.

Parrish JJ, Susko-Parrish JL, First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin: inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. *Biol Reprod* 1989a; 41:683-699.

Pavlok A, Torner H, Motlík J, Fulka J, Kauffold P, Duschinski U. Fertilization of bovine oocytes in vitro: effect of different sources of gametes on fertilization rates and frequency of fertilization anomalies. *Anim Reprod Sci* 1988; 16:207-213.

Pawshe CH, Totey SM, Jain SK. Methods of recovery of goat oocytes for in vitro maturation and fertilization *Theriogenology* 1994; 42(1):117-125.

Plachot M, Mandelbaum J, Junca AM. Acrosome reaction of human sperm used for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1984; 42(3):418-423.

Rehman N, Collins AR, Wright Jr RW. Effect of sperm exposure time on in vitro fertilization and embryo development of bovine oocytes. *Theriogenology* 1993; 39:294.

Saeki K, Nagao Y, Hoshi M, Nagai M. Effects of heparin, sperm concentration and bull variation on in vitro fertilization of bovine oocytes in a protein-free medium. *Theriogenology* 1995; 43:751-759.

Saeki K, Kato H, Hosoi Y, Miyake M, Utsumi K, Iritani A. Early morphological events of in vitro fertilized bovine oocytes with frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology* 1991; 35(5):1051-1058.

Song HB, Iritani A. In vitro fertilization of goat follicular oocytes with epididymal spermatozoa. *Korean J Anim Sci* 1988; 30(11):636-642.

Talbot P, Chacon R. A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm *J Exp Zool* 1981; 215:201-208.

Xu KP, Greve T. A detailed analysis of early events during in-vitro fertilization of bovine follicular oocytes. *J Reprod Fert* 1988; 82:127-134.

Yanagimachi R. Mammalian fertilization In: *The Physiology of Reproduction*, Second Edition. Eds E Knobil & JD Neill Raven Press Ltd, New York, 1994:189-317.

Yanagimachi R. Mammalian fertilization In: *The Physiology of Reproduction*. Eds E Knobil & JD Neill Raven Press, New York, 1988(1):135-185.

Younis AI, Zuelke KA, Harper KM, Oliveira MAL, Brackett BG. In vitro fertilization of goats oocytes. *Biol Reprod* 1991; 44:1177-1182.

CAPÍTULO 7

**INFLUENCIA DE DISTINTOS PARÁMETROS
SEMINALES SOBRE LA FIV**

INTRODUCCIÓN

El método más preciso para valorar la fertilidad del semen es el nacimiento de una cría, sin embargo requiere tiempo y dinero, y los resultados obtenidos pueden estar influenciados por multitud de factores dependientes de la hembra e incluso por factores ambientales o de manejo. Asimismo, la fertilidad de los espermatozoides es una función extremadamente compleja, que depende de las características espermáticas de movimiento, capacitación, reconocimiento celular, exocitosis y fusión de membranas, entre otras. Por lo tanto, para poder evaluar la aportación del semen en el éxito de la fecundación, tanto *in vivo* como *in vitro*, sería necesario la integración de varios métodos laboratoriales que nos permitieran conocer la cantidad de espermatozoides funcionales y potencialmente fértiles existentes en un eyaculado o muestra de espermatozoides, previamente a su utilización en la inseminación artificial (IA) o en la FIV. No obstante, el hecho de que se estén empleando varios métodos para determinar el poder fecundante de los espermatozoides, nos indica que todavía no existe un método capaz de predecir eficazmente la fertilidad del semen, a pesar de ser un objetivo de investigación frecuente, especialmente en el área de la IA. Ha sido sugerido que la evaluación de la capacitación podría proporcionar un mejor método de predicción de la fertilidad. Debido a que el proceso de la capacitación de los espermatozoides es difícilmente apreciable, la detección de espermatozoides vivos reaccionados ha sido el principal método para la valoración de dicho proceso. Sin embargo, la correlación entre la capacidad fecundante de los espermatozoides y la tasa de reacción acrosómica espontánea todavía es un tema de controversia, así como también si esta reacción espontánea es fisiológica (Mortimer y Camenzind, 1989) o incluso patológica (revisado por Yanagimachi, 1994).

No obstante, dado que la reacción acrosómica es una parte esencial del proceso de fecundación, y por lo tanto de los resultados de FIV, la distinción de la reacción acrosómica fisiológica (*verdadera*), que ocurre en los espermatozoides vivos y móviles, de las modificaciones degenerativas acrosómicas en los espermatozoides muertos o moribundos (reacción acrosómica *falsa*) podría ser de gran importancia para el estudio de la capacitación y la fecundación *in vitro*. Desafortunadamente, el estado acrosómico de los espermatozoides vivos y móviles, sin ningún tratamiento previo, sólo puede ser determinado en aquellas especies mamíferas que presentan un acrosoma de gran tamaño como los espermatozoides de cobaya (revisado por Yanagimachi, 1988). Por esta razón se ha desarrollado un gran número de métodos microscópicos, que incluyen tinciones y pruebas de fluorescencia, con el fin de poder evaluar conjuntamente el estado acrosómico y la viabilidad de los espermatozoides del resto de especies.

Entre las distintas técnicas de tinción que nos permiten diferenciar las reacciones acrosómicas verdaderas de las falsas, se encuentra la Triple Tinción (*triple-stain technique*, T.S.T.) descrita por primera vez en humana (Talbot y Chacon, 1981), la cual también ha sido posteriormente descrita en el caprino (Kusunoki et al., 1984), en el porcino (Vázquez y col., 1989), en el ovino (Garde y col., 1992), en el bovino (Didion y Graves, 1986) y en el caballo (Varner y col., 1987), así como en la mayoría de especies de laboratorio e incluso en algunas especies salvajes como el ciervo (Garde y col., 1994). Esta técnica permite clasificar a los espermatozoides en cuatro estados o categorías diferentes: 1) espermatozoides vivos con acrosoma intacto (acrosoma teñido de rosa y región post-acrosomal de color marrón muy pálido o blanco), 2) espermatozoides vivos que han experimentado la reacción acrosómica (región acrosomal y post-acrosomal de color marrón muy pálido o blanco), 3) espermatozoides

mueritos con acrosoma intacto (acrosoma teñido de rosa y región post-acrosomal de color marrón oscuro) y 4) espermatozoides mueritos sin acrosoma (región acrosomal y post-acrosomal de color marrón oscuro).

Los objetivos de este trabajo son: 1) analizar los cambios que experimentan los espermatozoides durante las diferentes etapas del proceso de la FIV, mediante el estudio de diferentes parámetros seminales como la motilidad, vitalidad e integridad acrosomal, 2) estudiar la posible existencia de correlaciones entre estos parámetros y los resultados de penetración y división de los ovocitos, con el fin de poder determinar qué parámetros seminales podrían ser utilizados para predecir la capacidad fecundante *in vitro* de los espermatozoides y 3) comprobar que la técnica de la Triple Tinción es válida como método para valorar el estado del acrosoma y la viabilidad espermática en nuestras condiciones.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la consecución de los objetivos anteriormente citados se realizaron un total de 66 experiencias. En cada una de las experiencias, se siguió la metodología descrita en el apartado general de material y métodos.

Valoración de los resultados

Tanto la recogida y procesamiento de las muestras de ovocitos como de espermatozoides, se realizaron siguiendo el método descrito en el apartado general de material y métodos. Brevemente, el método consistió en lo siguiente:

En primer lugar, se valoró la motilidad masal y volumen de los eyaculados y se mezclaron a partes iguales con el fin de minimizar la variación entre machos. Se tomó una alicuota de 50 μ l de esta mezcla y se diluyó en 2 ml de HEPES-TALP para valorar la motilidad, vitalidad, integridad acrosomal, morfoanomalías y la concentración espermática mediante una cámara de Neubauer (muestra inicial).

A continuación y durante las distintas fases del procesamiento de los espermatozoides, se recogieron alicuotas de la suspensión de espermatozoides inmediatamente después del lavado, de la pre-incubación con heparina y, por último, tras 17 horas de co-cultivo de los gametos, con el fin de valorar el porcentaje de espermatozoides móviles, vivos y con acrosoma normal.

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

Para la valoración del estadio nuclear de los ovocitos a las 17 horas de la inseminación, se extrajo de las gotas de fecundación una muestra de ovocitos que se separaron de los espermatozoides adheridos por agitación en un medio de citrato sódico al 3% y se fijaron en ácido acético-etanol (1:3 v/v) para su posterior tinción con lacmoide al 1%. A las 48 horas de la inseminación se evaluó la división del resto de los embriones.

RESULTADOS

Las características iniciales de los eyaculados utilizados en las distintas experiencias obtenidas tras la determinación de los parámetros seminales anteriormente citados se resumen en la tabla 1.

Motilidad, vitalidad y estado acrosomal

Los resultados de la valoración espermática obtenidos a lo largo de los distintos procesos de FIV realizados se muestran en las figuras 1 y 2.

Como ya ha sido observado anteriormente, la realización del *swim-up* mejora significativamente todos los parámetros seminales valorados inicialmente, a excepción del número de espermatozoides vivos que han sufrido la reacción acrosómica, el cual no se ve afectado. Respecto a la pre-incubación con heparina, no se observa ningún efecto en la vitalidad de los espermatozoides, pero afecta a la motilidad y al porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal, disminuyendo ambos significativamente. Por último, se observa que tanto la motilidad y vitalidad como el porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto disminuyen durante el co-cultivo con los ovocitos, al valorarlos a las 17 horas de la inseminación, mientras que el porcentaje de espermatozoides vivos que han sufrido la reacción acrosómica aumenta significativamente en comparación a las etapas previas del proceso de preparación de los espermatozoides para la FIV.

Respecto al resto de las categorías de espermatozoides determinadas por la T.S.T., se observa que el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma presenta una evolución muy similar a la de espermatozoides vivos totales, debido a que el porcentaje de espermatozoides vivos sin acrosoma es demasiado bajo para afectar significativamente en esta evolución. En relación a los espermatozoides muertos, se observa que tanto el porcentaje de espermatozoides muertos con acrosoma como sin acrosoma aumentan significativamente durante el co-cultivo de los gametos .

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

Al comparar los resultados obtenidos mediante la T.S.T con los obtenidos mediante la tinción vital de Eosina-Nigrosina (figura 3) y la técnica de la PSA (Figura 4) para determinar el porcentaje de espermatozoides vivos y el de acrosomas intactos, respectivamente, se han obtenido altas correlaciones ($R=0.91$ y $R=0.87$, $p=0.0001$) entre estas técnicas y la T.S.T.. No obstante, se encontraron diferencias significativas ($p=0.0001$) entre el número total de espermatozoides vivos valorado mediante la TST y la tinción de eosina-nigrosina (65.3% y 59.2, respectivamente). Asimismo también se observaron diferencias ($p=0.0001$) entre el porcentaje total de espermatozoides con acrosoma intacto valorado mediante la TST y la PSA (84.2% y 87.1%, respectivamente) (Figura 5).

Por otra parte, también se han encontrado altas correlaciones entre el porcentaje de motilidad y los porcentajes de vitalidad obtenidos con la tinción de eosina-nigrosina y la triple tinción ($R=0.80$ y $R=0.79$, $p=0.0001$, respectivamente).

Correlaciones entre las características seminales y la tasa de fecundación y división de los ovocitos.

Los resultados (LSmeans±error estándar) referentes a la tasa de fecundación y división de los ovocitos obtenidos en el total de las experiencias se resumen de la siguiente manera. De un total 960 ovocitos fijados a las 17 horas de la inseminación, 340 fueron penetrados ($36.2\pm 3.3\%$), de los cuales 135 fueron fecundados correctamente ($14.6\pm 1.6\%$), 117 poliespérmicos ($12.4\pm 1.9\%$) y 86 presentaban otras anomalías de fecundación ($9.0\pm 1.1\%$). Por otra parte, de los 2822 ovocitos que se mantuvieron en co-cultivo con células de la granulosa hasta las 48 post-inseminación, 961 se dividieron ($32.8\pm 2.8\%$), de los cuales 538 habían superado el estadio de 2 células ($18.7\pm 1.7\%$), mientras que los 423 restantes ($14.2\pm 1.3\%$) permanecieron en el estadio de 2 células.

Respecto a los diferentes parámetros seminales y las tasas de penetración y división, pocas han sido las correlaciones estadísticamente significativas encontradas. Además, entre estas escasas correlaciones, ninguna presentaba un alto coeficiente de correlación (R), el cual osciló entre valores de 0.27 a 0.32. En las tablas 2 y 3 se muestran los resultados obtenidos tras la comparación de los parámetros seminales y los porcentajes de penetración y división de los ovocitos.

Tabla 1: Características seminales iniciales de los eyaculados utilizados en las distintas experiencias de fecundación *in vitro*.

Parámetro seminal	LSmeans ± SEM
Volumen (ml)*	0.51 ± 0.02
Motilidad masal (0-5)*	3.50 ± 0.08
Concentración (x 10 ⁹ /ml)	4.021 ± 0.152
Motilidad individual (%)	64 ± 1
Vitalidad (%)	65.6 ± 1.8
Integridad acrosomal	86.5 ± 0.9
Morfoanomalías	9.1 ± 1.8

*Los parámetros señalados se refieren a los resultados obtenidos a partir de los eyaculados individualmente. El resto de parámetros se valoraron a partir de la mezcla de eyaculados.

Figura 1: Evolución de los porcentajes de motilidad, vitalidad e integridad del acrosoma de los espermatozoides durante el proceso de FIV.

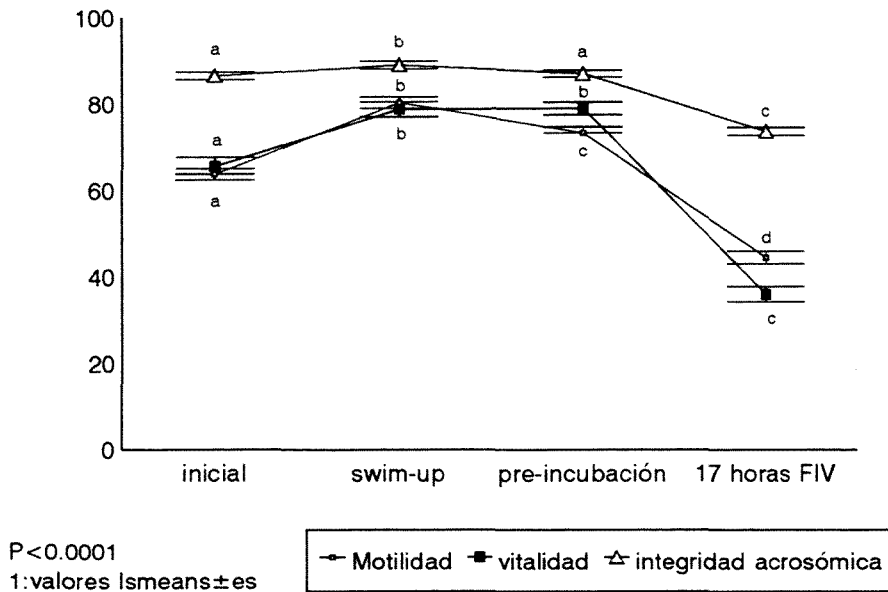


Figura 2: Evolución de las distintas categorías de espermatozoides obtenidas mediante la Triple Tinción durante el proceso de FIV.

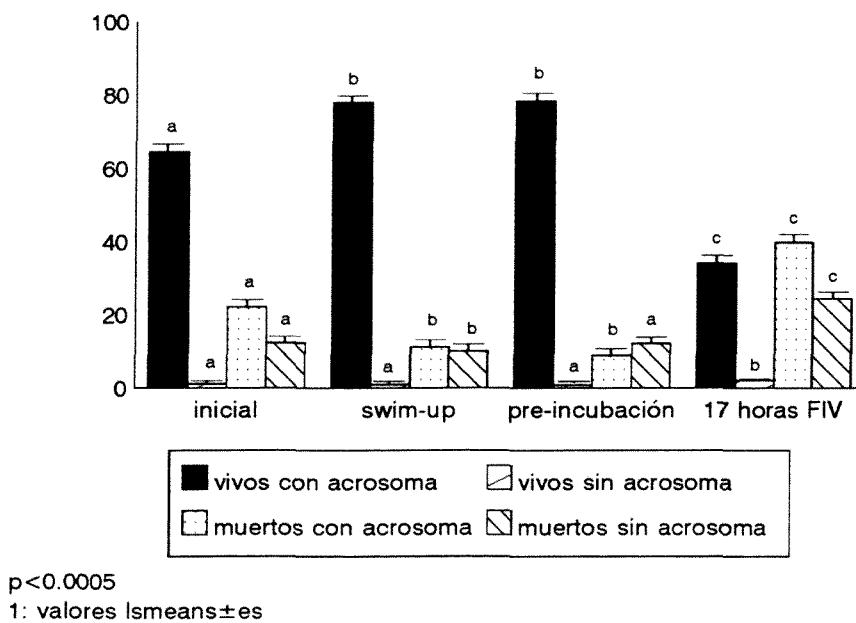
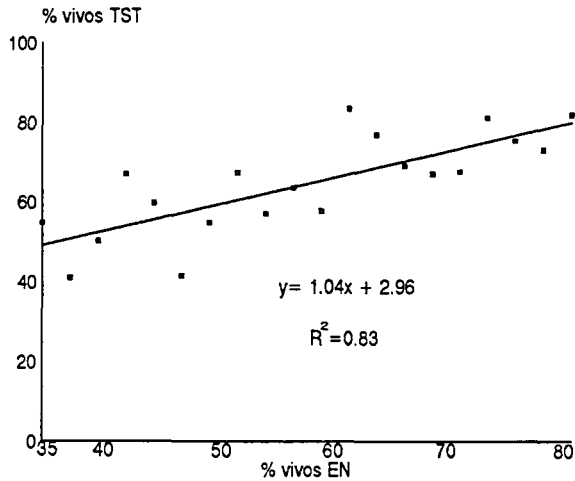
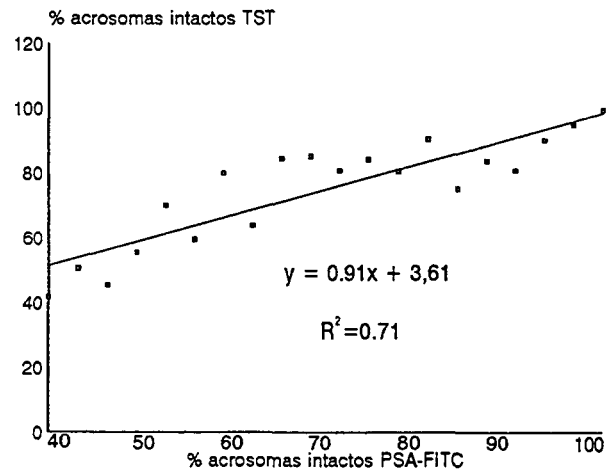


Figura 3: Recta de regresión entre la triple tinción (TST) y la tinción de Eosina-Nigrosina (EN) respecto a la determinación de la vitalidad de los espermatozoides.



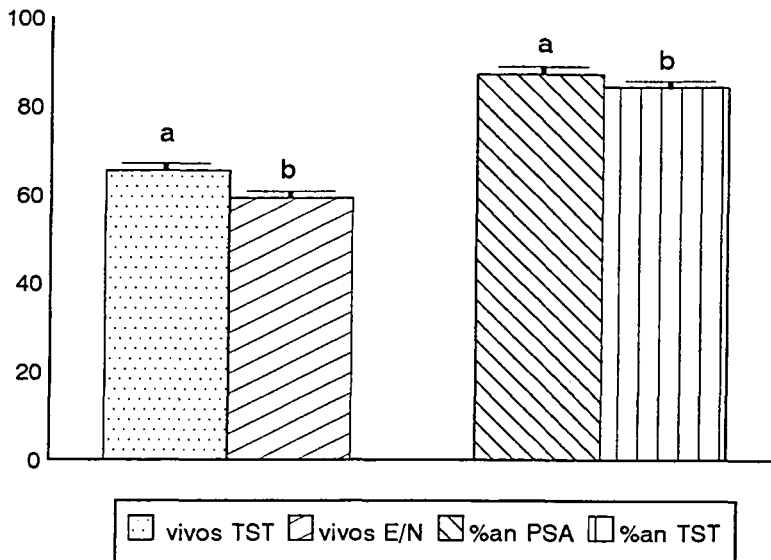
$p \leq 0.0001$

Figura 4: Recta de regresión entre la triple tinción (TST) y la técnica de la PSA-FITC respecto a la determinación de la integridad del acrosoma de los espermatozoides.



$p \leq 0.0001$

Figura 5: Efecto de la tinción sobre la determinación de la vitalidad (TST vs EN) y de la integridad del acrosoma (TST vs PSA-FITC) de los espermatozoides.



$p \leq 0.0001$

1: valores $|\text{means} \pm \text{es}$

Tabla 2: Correlación entre los resultados de penetración (17 horas post-inseminación) y división (48 h post-inseminación) de ovocitos de cabras prepúberes y los parámetros seminales valorados en: (a) tiempo inicial y (b) tras el *swim-up*.

Tiempo inicial	%Total Penetración			% 2PN+C			%PS			% 2 células			>2 células			%Total División		
	R	P	P	R	P	P	R	P	P	R	P	P	R	P	P	R	P	P
motilidad	-0.09	0.53	0.04	0.79	-0.13	0.34	-0.01	0.95	-0.03	0.81	-0.01	0.96	-0.03	0.81	-0.01	0.96	-0.01	0.96
vitalidad ¹	-0.02	0.90	-0.06	0.73	-0.16	0.38	-0.02	0.90	-0.03	0.87	-0.02	0.93	-0.03	0.87	-0.02	0.93	-0.02	0.93
integridad acrosómica ¹	-0.12	0.51	-0.25	0.17	-0.24	0.17	-0.12	0.49	0.02	0.90	-0.01	0.95	0.02	0.90	-0.01	0.95	-0.01	0.95
R.A.verdadera	-0.07	0.69	-0.12	0.50	-0.12	0.50	-0.23	0.20	0.01	0.95	-0.09	0.64	0.01	0.95	-0.09	0.64	-0.09	0.64

Tiempo swim-up	%Total Penetración			% 2PN+C			%PS			% 2 células			>2 células			%Total División		
	R	P	P	R	P	P	R	P	P	R	P	P	R	P	P	R	P	P
motilidad	0.26	0.06	0.16	0.24	0.30	0.03	0.28	0.04	0.27	0.04	0.30	0.02	0.27	0.04	0.30	0.02	0.30	0.02
vitalidad ¹	-0.20	0.27	-0.27	0.12	-0.28	0.11	-0.25	0.15	-0.02	0.90	-0.11	0.51	-0.02	0.90	-0.11	0.51	-0.11	0.51
integridad acrosómica ¹	-0.09	0.63	-0.14	0.42	-0.20	0.25	-0.20	0.27	-0.27	0.12	-0.28	0.11	-0.27	0.12	-0.28	0.11	-0.28	0.11
R.A.verdadera	0.06	0.73	-0.13	0.47	0.21	0.24	-0.26	0.12	-0.06	0.74	-0.14	0.41	-0.06	0.74	-0.14	0.41	-0.14	0.41

¹: valorado mediante TST. Penetración: 2PN+C= 2 pronúcleos + cola del espermatozoide, PS= poliespéricos. División: 2células= embriones de 2 células, >2células= embriones de más de 2 células. R= coeficiente de correlación, P= probabilidad. R.A.: reacción acrosómica

Tabla 3: Correlación entre los resultados de penetración (17 horas post-inseminación) y división (48 h post-inseminación) de ovocitos de cabras prepuéres y los parámetros seminales valorados en: (a) tras la pre-incubación con heparina y (b) a las 17 horas de la inseminación.

Tiempo pre-incubac.	%Total Penetración		%2PN+C		%PS		% 2 células		>2 células		%Total División	
	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P
motilidad	-0.02	0.91	-0.09	0.52	0.06	0.66	0.04	0.77	0.14	0.32	0.10	0.47
vitalidad ¹	-0.18	0.23	-0.18	0.23	-0.23	0.12	-0.27	0.06	0.02	0.90	-0.11	0.45
integridad acrosómica ¹	0.04	0.78	0.01	0.95	-0.08	0.62	-0.07	0.63	0.10	0.52	0.03	0.84
R.A.verdadera	-0.13	0.40	-0.04	0.82	-0.17	0.27	-0.02	0.89	0.12	0.42	0.06	0.67

Tiempo 17 h FIV	%Total Penetración		% 2PN+C		%PS		% 2 células		>2 células		%Total División	
	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P
motilidad	0.00	0.98	-0.06	0.69	0.03	0.82	0.05	0.72	-0.07	0.64	-0.02	0.87
vitalidad ¹	0.03	0.85	-0.06	0.73	0.05	0.78	-0.01	0.92	0.03	0.85	0.02	0.90
integridad acrosómica ¹	-0.09	0.59	-0.11	0.51	-0.22	0.20	-0.28	0.08	-0.18	0.28	-0.23	0.16
R.A.verdadera	0.15	0.37	0.02	0.90	0.19	0.27	0.20	0.21	0.32	0.04	0.32	0.04

¹: valorado mediante TST. Penetración: 2PN + C = 2 pronúcleos + cola del espermatozoide, PS= poliespérmicos. División: 2células= embriones de 2 células, >2células= embriones de más de 2 células. R= coeficiente de correlación, P= probabilidad. R.A.: reacción acrosómica.

DISCUSIÓN

La calidad del semen es esencial para el éxito de la FIV, por lo que el análisis de las características seminales, previo y durante su posterior utilización, podría aportar una considerable información acerca de los resultados de penetración y división de los ovocitos. No obstante, se ha de tener en consideración la existencia de otros muchos factores tan o incluso más determinantes del éxito de la fecundación que la capacidad fecundante de los espermatozoides.

En términos generales, la calidad espermática de los eyaculados utilizados en el presente trabajo es ligeramente inferior a la observada por varios autores en la raza Murciano-Granadina (revisado por MateoRex, 1990), probablemente debido al escaso número de machos utilizados y a que prácticamente la totalidad de experiencias se realizaron durante las estaciones de invierno y primavera (fotoperiodo ascendente), consideradas desfavorables para la calidad seminal en el caprino (Perez Llano y col., 1991; Roca y col., 1992). No obstante, al realizar sistemáticamente una selección de los espermatozoides mediante la técnica del *swim-up*, todos los parámetros seminales valorados fueron significativamente mejorados, a excepción del número de espermatozoides vivos con acrosoma reaccionado, el cual no se vió afectado. El hecho que los espermatozoides móviles seleccionados exhiban la misma tasa de reacción acrosómica verdadera que los no seleccionados no es de sorprender, ya que la motilidad y habilidad para reaccionar son dos funciones fisiológicas independientes del espermatozoide (Plachot y col., 1984).

Otro aspecto a tener en cuenta en la evolución de las características seminales a lo largo de la preparación de los espermatozoides para la FIV es la pre-incubación con heparina. Mientras que el porcentaje total de espermatozoides vivos no varió significativamente después de ser sometidos a la heparina, la motilidad y el porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto fueron significativamente menores. Aunque desconocemos la causa exacta de este efecto significativo de la pre-incubación, la subjetividad de la estimación de la motilidad puede haber interferido probablemente en los resultados obtenidos, teniendo en cuenta que la diferencia en el porcentaje de motilidad es de sólo un 8%. Asimismo, la diferencia observada en la integridad del acrosoma (un 2%) parece deberse al aumento significativo observado en el porcentaje de espermatozoides que una vez muertos han perdido el acrosoma, ya que ni el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma ni el de vivos reaccionados se ha visto afectado por la pre-incubación. El hecho de no observarse un aumento en la proporción de espermatozoides vivos que sufren la reacción acrosómica verdadera después de la pre-incubación con heparina parece ser debido a que: 1) la heparina es un agente capacitante más que inductor de la reacción acrosómica (Parrish y col., 1988), 2) la capacitación inducida por heparina requiere, al menos en espermatozoides bovinos, un tiempo mínimo de 4 horas de exposición a la heparina antes de que los cambios de la membrana plasmática relacionados con la reacción acrosómica sean detectados (Parrish y col., 1988) y 3) la presencia de glucosa (5mM) en el medio retrasa la capacitación inducida por heparina (Parrish y col., 1989).

Al igual que en el trabajo anterior, los resultados obtenidos a las 17 horas de la inseminación indican que los espermatozoides mueren durante el co-cultivo con los ovocitos, debido al tiempo transcurrido y probablemente también a que los espermatozoides que han sufrido la reacción acrosómica verdadera mueren rápidamente, como se observa en el incremento de los porcentajes de espermatozoides muertos con y sin acrosoma. Asimismo, en el presente trabajo

se observa un aumento significativo en la proporción de espermatozoides que sufren la reacción acrosómica verdadera, confirmando, al menos en parte, la existencia del ciclo continuo de evolución sugerido por Didion y col. (1989). No obstante, el porcentaje de espermatozoides vivos reaccionados obtenido a las 17 horas de la inseminación es bastante bajo, lo que podría ser debido a que las condiciones de cultivo fueran las adecuadas para la FIV, pero no para el estudio específico de la reacción acrosómica.

Por otra parte, debido a que la reacción acrosómica es un paso esencial en el proceso de la fecundación y una indicación de que el espermatozoide está capacitado, la habilidad de una población de espermatozoides de sufrir reacción acrosómica podría estar correlacionada con su habilidad fecundante, por lo que la utilización de tinciones capaces de discernir la reacción acrosómica verdadera podría ser de gran interés en los estudios de FIV. Kusunoki y col. (1984) demostraron que la técnica simplificada de la Triple Tinción descrita para el caprino era un método perfectamente válido para evaluar simultáneamente la viabilidad y el estado acrosómico del espermatozoide de macho cabrío.

En el presente trabajo, bajo nuestras condiciones, también hemos podido comprobar que la Triple Tinción es válida respecto a la determinación de espermatozoides vivos, obteniendo una alta correlación ($R=0.91$, $p=0.0001$) entre esta técnica y la tinción de eosina-nigrosina, coeficiente muy similar al obtenido por Kusunoki y col. (1984) ($R=0.89$, $p<0.001$) al comparar las mismas técnicas. No obstante, a pesar de la alta correlación obtenida, el porcentaje de espermatozoides vivos obtenido con la TST fue significativamente superior al obtenido mediante la tinción de eosina-nigrosina, lo que parece sugerir que, o bien el azul Tripan utilizado en la TST causa errores en la clasificación de los espermatozoides viables (Kawakami y col., 1993), o bien los espermatozoides que son parcialmente teñidos por la eosina, considerados como no-viables, son realmente viables (Aalseth y Saacke, 1986). Otra posible explicación también podría ser que la incubación de los espermatozoides con el colorante de eosina-nigrosina provoque la muerte sistemática de una proporción de los espermatozoides. No obstante, al comparar los porcentajes de viabilidad de los espermatozoides, obtenidos con la TST y con la tinción de eosina-nigrosina, y el porcentaje de motilidad valorada subjetivamente en el microscopio se obtuvieron correlaciones muy similares ($R=0.79$ y $R=0.80$, $p<0.0001$, respectivamente).

Respecto a la evaluación del estado acrosomal mediante la TST, también hemos observado una alta correlación ($R=0.87$, $p=0.0001$) entre esta tinción y la técnica de FITC-PSA en la determinación del porcentaje de espermatozoides con acrosomas intactos. Estos resultados confirman la validez de la TST, ya que Berger (1990) observó que una técnica basada en FITC-PSA, similar a la utilizada en nuestro trabajo, se correlacionaba significativamente con la valoración del estado del acrosoma mediante microscopio electrónico de transmisión (MET) en espermatozoides caprinos congelados. Sin embargo, también detectó que la FITC-PSA tendía a subestimar el porcentaje de espermatozoides sin acrosoma, comparada con la técnica del MET. En el presente trabajo hemos observado diferencias significativas entre el porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto valorado mediante la TST (84.2%) y el valorado mediante la FITC-PSA (87.1%), a pesar del alto coeficiente de correlación existente entre ambas técnicas. Esto parecería confirmar los resultados obtenidos por Berger (1990) respecto a la fiabilidad de la técnica de la FITC-PSA en espermatozoides caprinos. No obstante, en todas las técnicas se pueden observar espermatozoides que son difícilmente clasificables como reaccionados o intactos. Esto no es un serio problema si el número de espermatozoides

ambiguos es bajo comparado con el número de espermatozoides de la categoría identificada (Cross y Meizel, 1989). Sin embargo, en nuestro caso, donde el número de espermatozoides vivos reaccionados es considerablemente pequeño, el nivel de incertidumbre puede variar sustancialmente los resultados.

Desafortunadamente, pocos estudios han sido realizados en las especies domésticas sobre la correlación entre distintos parámetros seminales y las tasas de FIV. Por el contrario, numerosos esfuerzos se han centrado en el estudio de la predicción del poder fecundante de los espermatozoides *in vivo*, obteniendo bajas correlaciones entre los métodos convencionales de contrastación seminal y la fertilidad (revisado por den Dass, 1992; Boixo, 1994). Concretamente en el caprino, Berger y col. (1994) observaron que el análisis de la motilidad, integridad acrosomal y la habilidad de los espermatozoides a sufrir la reacción acrosómica durante la capacitación *in vitro* no se correlacionaban con las diferencias en la capacidad fecundante *in vivo* del semen congelado utilizado. Sin embargo, Blotner y col. (1990) sugirieron que la valoración directa de la proporción de espermatozoides que sufren la reacción acrosómica *in vitro* facilitada por la incubación con heparina podría ser un posible indicador de fertilidad *in vivo* e *in vitro* en el bovino. Concretamente, estos autores obtuvieron correlaciones entre el porcentaje de reacción acrosómica inducida tras el tratamiento con heparina y la tasa de no-retorno ($R=0.61$, $p<0.05$) y la tasa de FIV ($R=0.62$), aunque ésta última no fue significativa debido al escaso número de ovocitos. También Whitfield y Parkison (1992) obtuvieron una alta correlación ($R=0.86$, $p<0.001$) entre el incremento de la incidencia de reacción acrosómica y la tasa de no-retorno en el día 90.

En el presente trabajo, al intentar correlacionar las tasas de penetración y división de los ovocitos con los distintos parámetros evaluados inmediatamente después de mezclar los distintos eyaculados, los resultados obtenidos demuestran que los análisis convencionales de la calidad seminal (concentración, motilidad, viabilidad, integridad del acrosoma y % de morfoanomalías) no parecen tener valor predictivo sobre el éxito de la FIV. Estos resultados parecen indicar que las variaciones observadas en estos parámetros seminales, valorados inicialmente en las distintas experiencias, están dentro de un rango de valores aceptables sin llegar a afectar la tasa de FIV. Por otra parte, hay que tener en cuenta que la técnica del *swim-up* mejora significativamente estos parámetros, lo que puede explicar también la incapacidad de estos parámetros iniciales para detectar diferencias en las tasas de fecundación.

El análisis de los valores seminales obtenidos después de realizar el *swim-up* mostró bajos coeficientes de correlación (rango= 0.26-0.30), aunque significativos ($p<0.05$) entre la motilidad de los espermatozoides y las tasas de penetración total, poliespermia y división de los ovocitos, tanto en el porcentaje de embriones de 2 y de más de 2 células como en el porcentaje total de embriones. Resultados muy similares han sido observados en la especie humana por Duncan y col. (1993), quién encontró una correlación significativa entre el porcentaje de motilidad valorado en la fracción de espermatozoides móviles seleccionados y la tasa de fecundación ($R=0.32$, $p<0.001$). A pesar de las bajas correlaciones encontradas en ambos trabajos, estos resultados confirman la importancia de valorar los espermatozoides después de realizar el *swim-up*, ya que son los espermatozoides seleccionados los que serán utilizados para la inseminación de los ovocitos. Así, el análisis de los espermatozoides seleccionados, más que el de la muestra inicial de semen, parece proporcionar más información sobre el potencial fecundante de los espermatozoides (Barlow y col., 1991)

Después de la pre-incubación de los espermatozoides con heparina, ninguno de los parámetros evaluados se correlacionó con los resultados de FIV. Por otra parte, a las 17 horas de la inseminación de los ovocitos, las únicas correlaciones significativas observadas fueron entre la incidencia de reacción acrosómica verdadera espontánea y el porcentaje total de división y el de embriones que habían superado el estadio de 2 células, siendo también los coeficientes muy bajos ($R=0.32$ en ambos casos, $p<0.05$). Esta baja correlación parece indicar que la capacidad del espermatozoide de fecundar los ovocitos y la habilidad de sufrir la reacción acrosómica espontánea son dos funciones independientes del espermatozoide. Por otra parte, Berger (1990), con semen caprino congelado, no observó correlación significativa entre el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma reaccionado valorado tras 12 horas de incubación y la habilidad de penetrar ovocitos de hámster libres de zona pelucida. En el porcino, Vazquez (1991) concluye que el número de espermatozoides que presentan reacción acrosómica verdadera no está relacionado con la tasa de penetración *in vitro* de ovocitos madurados *in vivo*. Asimismo en la especie humana, algunos autores tampoco han encontrado ninguna correlación entre el porcentaje de espermatozoides vivos reaccionados que nadan libremente en el medio y la tasa de FIV (Plachot y col.,1984; De Jonge y col., 1988).

En conclusión, los resultados presentados parecen confirmar que, en nuestras condiciones, las características iniciales, la evolución a lo largo del proceso y la capacidad de los espermatozoides de sufrir la reacción acrosómica no son buenos predictores del éxito de la FIV. Asimismo, las variaciones observadas en todos los parámetros seminales valorados en las distintas experiencias parecen estar dentro de un rango de valores aceptables que no influyen sobre la tasa de FIV, lo que parece indicar la intervención de otros factores, independientes a la calidad seminal, más determinantes de los resultados de FIV de ovocitos de cabras prepúberes madurados *in vitro*.

BIBLIOGRAFÍA

Aalseth EP, Saacke RG. Vital staining and acrosomal evaluation of bovine sperm. Gamete Res 1986; 15:73-81.

Barlow P, Delvigne A, Van Dromme J, Van Hoeck J, Vandenbosch K, Leroy, F. Predictive value of classical and automated sperm analysis for in-vitro fertilization. Hum Reprod 1991; 6:1119-1124.

Berger T, Drobnis EZ, Foley L, Metzler JK, Horton M. Evaluation of relative fertility of cryopreserved goat sperm. Theriogenology 1994; 41:711-717.

Berger, T. Pisum sativum agglutinin used as an acrosomal stain of porcine and caprine sperm. Theriogenology 1990; 33(3):689-695.

Blottner S, Nehring H, Torner H. (1990) Individual differences in capacitation of bull spermatozoa by heparin in vitro: relationship to fertility. Theriogenology 1990; 34(3):619-628.

Boixo Pérez-Holanda, JC. Valoración laboratorial de la calidad seminal. Correlación con la fertilidad. Proc 7ª Jornadas Int Reprod Anim, Murcia, 1994:61-69.

Cross NL, Meizel S. Methods of evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. Biol

Reprod 1989; 41:635-641.

De Jonge CJ, Rawlins RG, Zaneveld LJD. Induction of the human sperm acrosome by human oocytes. Fertil Steril 1988; 50(6):949-953.

Den Daas N. Laboratory assessment of semen characteristics. Anim Reprod Sci 1992; 28:87-94.

Didion BA, Dobrinsky JR, Giles JR, Graves CN. Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. Gamete Res 1989; 22:51-57.

Didion B, Graves C. In vivo capacitation and acrosome reaction of bovine sperm in estrous and diestrous cows J Anim Sci 1986; 62:1029-1033.

Duncan WW, Glew MJ, Wang XJ, Flaherty SP, Matthews CD. Prediction of in vitro rates from semen variables. Fertil Steril 1993; 59(6):1233-1238.

Garde J, García Artiga C, Gutiérrez A, Vázquez I (1992) Triple tinción para valorar acrosomas normales y viabilidad espermática en semen ovino. Med Vet 1992; 9(2):107-113.

Garde J, Aguado MJ, Garrido D, Montoro V. Use of a triple stain technique to assess the acrosomal status of deer sperm. J Reprod Fert 1994; Abstract series n°13:33 (96).

Hancock JL. A staining technique for the study of temperature shock in semen. Nature 1951; 167:323-324.

Kawakami E, Vandervoort CA, Mahi-Brown CA, Tollner TL, Overstreet JW. Comparison of a fluoresceinated lectin stain with triple staining for evaluating acrosome reactions of dog sperm. J Exp Zool 1993; 265:599-603.

Kusunoki H, Yasui T, Kato S, Kanda S. Identification of acrosome-reacted goat spermatozoa by a simplified triple-stain technique. Jpn J Zootech Sci; 55(11):832-837.

Mateo Rex E. Avances en reproducción caprina. Mundo Ganadero 1990; 9:41-51.

Mortimer D, Camenzind AR. The role of follicular fluid in inducing the acrosome reaction of human spermatozoa incubated in vitro. Human Reprod 1989; 4(2):169-174.

Parrish JJ, Susko-Parrish JL, First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin: inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. Biol Reprod 1989; 41:683-699.

Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Winer MA, First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin. Biol Reprod 1988; 38:1171-1180.

Perez Llano B, Mateos Rex E, Pintado B. Características seminales del ganado caprino de la raza verata. ITEA, 1991: vol extra, N°11(1):40-42.

Plachot M, Mandelbaum J, Junca AM. Acrosome reaction of human sperm used for in vitro

fertilization. Fertil Steril 1984; 42(3):418-423.

Roca J, Martinez E, Sánchez-Valverde MA, Ruiz S, Vázquez JM. Seasonal variations of semen quality in male goats: study of sperm abnormalities. Theriogenology 1992; 38:115-125.

Talbot P, Chacon R. A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. J Exp Zool 1981; 215:201-208.

Varner DD, Ward CR, Storey BT, Kenney RM. Induction and characterization of acrosome reaction in equine sperm. Am J Vet Res 1987; 48:1383-1389.

Vázquez JM, Martinez E, Roca J, Ruiz S, Carrizosa JA. Identificación del estado acrosomal y viabilidad de los espermatozoides de verraco por una técnica de triple tinción (TST). 4ª Jornadas Internacionales de Reproducción Animal e Inseminación Artificial, León, 1989:35-38.

Vázquez JM. Fecundación *in vitro* en la especie porcina: Análisis de la capacitación y reacción acrosómica. Tesis Doctoral, Universidad de Murcia 1991.

Whitfield CH, Parkison TJ. Relationship between fertility of bovine semen and *in vitro* induction of acrosome reactions by heparin. Theriogenology 1992; 38:11-20.

Yanagimachi, R. Mammalian fertilization. In: The Physiology of Reproduction, Second Edition, Eds E Knobil & JD Neill, Raven Press Ltd, New York, 1994:189-317.

Yanagimachi, R. Mammalian fertilization. In: The Physiology of Reproduction. Eds E Knobil & JD Neill. Raven Press, New York, 1988:(1)135-185.

CAPÍTULO 8

DISCUSIÓN GENERAL

La realización de distintos métodos de lavado y selección de los espermatozoides para la FIV no ha influido en la tasa de penetración y división *in vitro* de los ovocitos, a pesar de haberse encontrado diferencias significativas en los parámetros seminales estudiados, lo que cuestiona, al menos en nuestro caso, la necesidad o importancia de lavar y seleccionar los espermatozoides. De hecho, Martínez y col. (1994) han demostrado que los espermatozoides de cerdo sufren la capacitación y reacción acrosómica verdadera durante el co-cultivo con los ovocitos, aún en ausencia de lavados.

En nuestro caso, la simple dilución a la que es sometido el semen durante la preparación de los espermatozoides, junto a la incubación con heparina, ha sido suficiente para que los espermatozoides caprinos sean capaces de fecundar, sin que la presencia del plasma seminal afecte las tasas de FIV. Estos resultados parecen indicar que las mezclas de eyaculados utilizadas presentan unas características iniciales suficientemente aceptables para no influir decisivamente en los resultados de FIV, por lo que al mejorar significativamente dichas características, mediante la realización de métodos como el *swim-up*, no se observó un aumento en la tasa de penetración y división embrionaria. Consecuentemente, la necesidad de realizar una selección de los espermatozoides para su utilización en la FIV podría depender de la calidad inicial de la muestra. No obstante, el efecto de estos métodos de lavado/selección y de los parámetros seminales, como los aquí valorados, sobre las tasas de FIV, es todavía uno de los principales objetivos de investigación, especialmente en la especie humana, donde ciertos casos de infertilidad podrían ser solventados con el uso de estas técnicas (Ng y col., 1992).

Por otra parte, ha sido posible confirmar que la utilización de heparina, como agente inductor de la capacitación de los espermatozoides, estimula la fecundación y división de los ovocitos de cabras prepúberes madurados *in vitro*, ya que en su ausencia los resultados obtenidos fueron significativamente inferiores. Este efecto beneficioso de la heparina ha sido observado por numerosos autores en el bovino (Parrish y col., 1984, 1985; Lu y Gordon, 1988; Leclerc y col., 1992, Saeki y col. (1995) y en el caprino (Younis y col., 1991; Ling y col., 1992; Cox y col., 1994, 1995). La ausencia de efecto del tiempo de pre-incubación con la heparina observada en nuestros resultados nos indica la posibilidad de adicionar la heparina directamente en el medio de fecundación, lo que nos permitiría evitar una manipulación innecesaria de los espermatozoides. No obstante, la concentración de heparina introducida en el medio de fecundación sí parece afectar el desarrollo embrionario. De hecho, a pesar de no observar diferencias en la tasa de penetración entre las concentraciones de heparina utilizadas en este trabajo, los resultados parecen indicar que una concentración en la pre-incubación de los espermatozoides de 5 µg/ml de heparina (aprox. 0.25 µg/ml en la gota de FIV) parece ser insuficiente para que los embriones se desarrollen. Así, al examinar el efecto de la concentración de heparina en el medio de fecundación (rango:0.05-2.0 µg/ml) sobre el desarrollo embrionario, Guyader y col. (1990) obtuvieron el máximo porcentaje de embriones cuando la FIV ocurría en presencia de 1 µg/ml de heparina.

Al comparar concentraciones de 0.5, 1, 2 y 4×10^6 de espermatozoides vivos en la gota de FIV, los resultados obtenidos indican que, en nuestras condiciones, la concentración óptima es de 4×10^6 , ya que nos proporcionó las mayores tasas de penetración total, fecundación normal y división total, a pesar de no diferir significativamente de las obtenidas con la concentración inmediatamente inferior (2×10^6). No obstante, el porcentaje de embriones que superaron el estadio de 2 células fue significativamente superior, cuando se utilizó una concentración de

4×10^6 . Esta concentración es bastante superior a la utilizada (1×10^6 espermatozoides/ml) por la mayoría de los grupos que trabajan en caprino (De Smedt y col., 1992; Cox y col., 1994; Younis y col., 1991). La necesidad de cuadruplicar (o incluso más) la concentración para obtener resultados comparables, teniendo siempre en cuenta que en nuestro caso utilizamos ovocitos procedentes de animales prepúberes, parece indicar que nuestro sistema de capacitación y fecundación *in vitro* no es tan efectivo como el del resto de equipos. Esto podría explicar la necesidad de inseminar con una mayor concentración de espermatozoides para obtener un número suficiente de espermatozoides correctamente capacitados y capaces de fecundar un porcentaje aceptable de ovocitos (Crozet, 1991b).

En nuestras condiciones, al menos una población de los espermatozoides puestos en contacto con los ovocitos han sido capaces de alcanzar los estadios finales de la capacitación, sufrir la reacción acrosómica, penetrar la zona pelúcida y fusionarse con el ovocito entre 2 y 4 horas de co-cultivo. Se han descrito diferentes tiempos mínimos de penetración de ovocitos madurados *in vitro* en las distintas especies, como 3 horas (Saeki y col., 1991), 6 horas (Xu y Greve, 1988) y 8 horas (Hyttel y col., 1988) en el bovino, 2 horas en el ovino (Cheng, 1985) y 1 hora en el caprino (Cox y col., 1995), lo que parece reflejar diferencias en la eficacia del sistema de capacitación utilizado, además de las propias de cada especie. De hecho, Parrish y col. (1988a) demostraron que la capacitación inducida por heparina en espermatozoides bovinos requería un mínimo de 4 horas de incubación para que los espermatozoides fueran capaces de fecundar.

Respecto a la evolución de la incidencia de la reacción acrosómica espontánea de los espermatozoides en el medio de FIV, se observó un incremento en este parámetro con el tiempo, hasta alcanzar el valor máximo a las 10 horas de la inseminación, pero disminuyendo posteriormente hasta obtener a las 28 horas valores inferiores incluso a los presentados en el inicio del co-cultivo. En el bovino, Fukui (1990) observó que la proporción de espermatozoides vivos reaccionados aumentaba significativamente a las 3 horas del inicio de la inseminación de los complejos cumulus-ovocito, obteniendo el valor máximo de reacción acrosómica espontánea a las 6 horas, porcentaje que fue disminuyendo en las posteriores observaciones realizadas. Una evolución similar de la reacción acrosómica verdadera se obtuvo durante la incubación en ausencia de ovocitos de espermatozoides eyaculados de morueco (Garde y col., 1992) y de espermatozoides de la cola del epidídimo de ciervo (*Cervus elaphus*) (Aguado y col., 1994), obteniendo los porcentajes máximos a las 6 horas y a las 6-9 horas, respectivamente. También en la especie humana, se ha demostrado un incremento en el porcentaje de espermatozoides vivos reaccionados durante las primeras 6 horas de incubación, presentando valores similares durante las siguientes 6 horas (Talbot y Chacon, 1981).

El retraso observado en nuestro trabajo, respecto a estos autores, en la aparición del porcentaje máximo de espermatozoides vivos reaccionados podría deberse, a parte de las diferencias existentes entre especies, a que la capacitación inducida por heparina es retrasada por el efecto de la glucosa añadida en el medio (Parrish y col., 1989). Parrish y col. (1989) demostraron que la capacitación de espermatozoides bovinos requería periodos de incubación largos (12 horas) en presencia de heparina y glucosa, lo que podría explicar, al menos en parte, que la máxima incidencia de reacción acrosómica, en nuestro trabajo, se obtuviera a las 8-12 horas de la inseminación.

En el presente trabajo no ha sido posible correlacionar los resultados de reacción acrosómica verdadera con la tasa de penetración, lo que parece sugerir o bien que la incidencia de la reacción acrosómica no es un parámetro útil para predecir la capacidad fecundante de la muestra de espermatozoides o que el número de experiencias realizadas ha sido insuficiente para obtener dicha correlación. Sin embargo, el hecho de que haya sido observado el porcentaje máximo de penetración de los ovocitos a las 12 horas de la inseminación y que la mayor incidencia de reacción acrosómica se consiga entre las 8-12 horas, podría indicar una cierta relación entre ambos fenómenos.

Por otra parte, las bajas correlaciones significativas observadas entre la incidencia de reacción acrosómica verdadera espontánea, valorada a las 17 horas de la inseminación en la totalidad de las experiencias realizadas, y el porcentaje total de división y el de embriones que habían superado el estadio de 2 células parecen indicar que la capacidad del espermatozoide de fecundar y la habilidad de sufrir la reacción acrosómica espontánea son dos funciones independientes del espermatozoide. Estos resultados parecen cuestionar el interés de valorar este parámetro con el fin de poder predecir el éxito de la FIV. De hecho, en el porcino Vazquez (1991) concluye que el número de espermatozoides que presentan reacción acrosómica verdadera no está relacionado con la tasa de penetración de ovocitos madurados *in vivo*. Asimismo en la especie humana, algunos autores tampoco han encontrado ninguna correlación entre el porcentaje de espermatozoides vivos reaccionados en el medio y la tasa de FIV (Plachot y col., 1984; De Jonge y col., 1988). No obstante, la presencia de los complejos cumulus-ovocito de cabras prepúberes madurados *in vitro* parece favorecer la reacción acrosómica verdadera de los espermatozoides. De Jonge y col. (1988) sugirieron que los componentes celulares que inducen la reacción acrosómica están asociados a todos los ovocitos, independientemente de su madurez y capacidad de ser fecundados.

Respecto a las características de motilidad, vitalidad e integridad del acrosoma de los espermatozoides, los resultados parecen confirmar que, en nuestras condiciones, tanto al inicio como a lo largo del proceso, no son buenos predictores del éxito de la FIV. Asimismo, las variaciones observadas en todos los parámetros seminales valorados en las distintas experiencias parecen estar dentro de un rango de valores aceptables que no influyen sobre la tasa de FIV. Esto parece confirmar que, en nuestras condiciones, la intervención de otros factores independientes a la calidad seminal son más determinantes de los resultados de FIV de ovocitos de cabras prepúberes madurados *in vitro*.

CAPÍTULO 9
CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1- En nuestras condiciones, con machos de probada fertilidad, no es necesario la realización de técnicas de lavado y selección de los espermatozoides para la obtención de embriones a partir de ovocitos de cabras prepúberes madurados y fecundados *in vitro*.
- 2- La utilización de heparina para la inducción *in vitro* de la capacitación de los espermatozoides caprinos incrementa significativamente los resultados de FIV.
- 3- Las concentraciones altas de heparina (50 y 100 $\mu\text{g/ml}$) en el medio de pre-incubación de los espermatozoides proporcionan los mejores resultados de división embrionaria.
- 4- El tiempo de pre-incubación de los espermatozoides con la heparina no afecta los resultados de FIV.
- 5- Una concentración de 4×10^6 espermatozoides vivos/ml en las gotas de FIV proporciona el mayor número de embriones que han superado el estadio de 2 células.
- 6- La incidencia de reacción acrosómica espontánea no está relacionada con la tasa de penetración.
- 7- La presencia de los complejos cumulus-ovocito favorece la incidencia de reacción acrosómica espontánea.
- 8- Entre las 8 y 12 horas del co-cultivo de los gametos se detecta un incremento en el número de espermatozoides vivos que sufren la reacción acrosómica espontánea.
- 9- Los parámetros seminales evaluados (motilidad, vitalidad e integridad del acrosoma) a lo largo del proceso de preparación de los espermatozoides no influye sobre los resultados de FIV de ovocitos de cabras prepúberes madurados *in vitro*.

CAPÍTULO 10
BIBLIOGRAFÍA

Aalseth EP, Saacke RG. Vital staining and acrosomal evaluation of bovine sperm. *Gamete Res* 1986; 15:73-81.

Acott TS, Hoskins D. Bovine sperm forward motility protein: Binding to epididymal spermatozoa. *Biol Reprod* 1981; 24:234-240.

Aguado MJ, Madridano JM, Gracia O, Gallego R, Ayllón E, Garde JJ. *Proc 7ª Jornadas Int Reprod Anim, Murcia, 1994:109.*

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

Ahuja KK. Carbohydrate determinants involved in mammalian fertilization. *Am J Anat* 1985; 174:207-223.

Aitken RJ, Clarkson JS. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J Androl* 1988; 9:367-376.

Akerlof E, Fredicson B, Gustafsson O, Lundin A, Lunell NO, Nylund L, Rosenborg L, Pousette A. Comparison between a swim-up and a Percoll gradient technique for the separation of human spermatozoa. *Int J Androl* 1987; 10:663-669.

Alvarez JG, Storey BT. Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biol Reprod.* 1983; 29:548-555.

Alvarez JG, Lasso JL, Blasco L, Nuñez RC, Heyner S, Caballero PP, Storey BT. Centrifugation of human spermatozoa induces sublethal damage; separation of human spermatozoa from seminal plasma by dextran swim-up procedure without centrifugation extends their motile lifetime. *Human Reprod* 1993; 8:1087-1092.

Amann RP. Function of the epididymis in bulls and rams. *J Reprod Fert (Suppl)* 1987; 34: 115-131.

Amann, RP. Maturarion of spermatozoa. *Proc. 11th Inter.Congr.Anim.Reprod.,1988:320-328*

Andrews JC, Bavister BD. Chemical capacitation of hamster spermatozoa in a protein free medium with divalent cation chelators and the subsequent requeriments for albumin for zona pellucida penetration. *Biol Reprod* 1988; 38(1):Abs.32.

Andrews JC, Bavister BD. Capacitation of hamster spermatozoa with the divalent cation chelators D-penicillamine, L-histidine, and L-cysteine in a protein free culture medium. *Gamete Res* 1989; 23:159-170.

Angle MJ, Tom R, Jarvi K, McClure RD. Effect of platelet-activating factor (PAF) on human spermatozoa-oocyte interactions. *J Reprod Fert* 1993; 98:541-548.

- Austin CR. Capacitation of spermatozoa. *Int J Fert* 1967; 12:25-31.
- Austin, CR. The "capacitation" of the mammalian sperm. *Nature* 1952; 170:326.
- Austin CR. Sperm maturation in the male and female genital tract. In: *Biology of Fertilization* Eds. CB Metz & A.Monroy. Academic Press, New York, 1985(2):121-155.
- Austin CR. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust J Sci Res (B)* 1951; 4:581-596.
- Awano M, Kawaguchi A, Morhi H. Lipid composition of hamster epididymal spermatozoa. *J Reprod Fert* 1993; 99:375-383.
- Ax RL, Lenz RW. Glycosaminoglycans as probes to monitor differences in fertility of bulls. *J Dairy Sci* 1987; 70(7):1477-1485.
- Baldi E, Casano R, Falsetti C, Krausz C, Maggi M, Forti G. Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa. *J Androl* 1991; 12:323-330.
- Ball GD, Leibfried ML, Lenz RW, Ax RL, Bavister BD, First NL. Factors affecting successful in vitro fertilization of bovine follicular oocytes. *Biol Reprod* 1983; 28:717-725.
- Ball GD, First NL. Fertility of ejaculated bull sperm in vitro after exposure to caffeine and cAMP. *J Anim Sci* 1983; 57(1):317.
- Bavister BD, Yanagimachi R. The effects of sperm extracts and energy sources on the motility and acrosome reaction of hamster spermatozoa in vitro. *Biol Reprod* 1977; 16:228-237.
- Bearer EL, Friend DS. Modifications of anionic-lipid domains preceding membrane fusion in guinea pig sperm. *J Cell Biol* 1982; 92, 604-615.
- Bedford JM. Maturation, transport and fate of spermatozoa in the epididymis. En: *Handbook of Physiology, Male Reproductive System, sect.7: Endocrinology*. Eds. DW Hamilton & RO Greep. American Physiological Society, Washington, D.C. 1975(5):303-317.
- Bedford JM, Calvin HI. Changes in -S-S-linked structures of the sperm tail during epididymal maturation, with comparative observation in sub-mammalian species. *J Exp Zool* 1974; 188:137-156.
- Bedford JM. Sperm capacitation and fertilization in mammals. *Biol Reprod* 1970; 2:128-158.
- Bedford JM. Fertilization. En: *Reproduction in mammals: Germ cells and fertilization*. (2nd edition). Vol.1 1987; pp:128-163. Eds. C.R. Austin & R.V. Short. Cambridge University Press.
- Bellvé AR, O'Brien DA. The mammalian spermatozoon: Structure and temporal assembly. En: *Mechanism and control of animal fertilization*. Ed. J.F. Hartman. Academic Press 1983; pp:55-

137.

Berger T, Clegg ED. Adenylate cyclase activity in porcine sperm in response to female reproductive tract secretions. *Gamete Res* 1983; 7:169-177.

Berger T. Pisum sativum agglutinin used as an acrosomal stain of porcine and caprine sperm. *Theriogenology* 1990; 33(3):689-695.

Berger T, Marrs RP, Moyer DL. (1985). Comparison of techniques for selection of motile spermatozoa. *Fert Steril* 1985; 43:268-273.

Berger T, Horton MB. Evaluation of assay conditions for the zona-free hamster ova bioassay of boar sperm fertility. *Gamete Res* 1988; 19:101-111.

Berger T, Parker K. Modification of the zona-free hamster ova bioassay of boar sperm fertility and correlation with *in vivo* fertility. *Gamete Res* 1989; 22:385-397.

Berruti G, Franchi M. Calcium and polyphosphoinositides: their distribution in relation to the membrane changes occurring in the head of boar spermatozoa. *Eur J Cell Biol* 1986; 41:238-245.

Besançon J, Dacheux JL, Paquin R, Tremblay RR. Major contribution of epididymis to glucosidase content of ram seminal plasma. *Biol Reprod* 1985; 33:296-301.

Bhattacharyya A, Roldan ERS, Yanagimachi R. Requirement of monovalent cations in the acrosome reaction of guinea pig spermatozoa. *Gamete Res* 1986; 15:285-294.

Bhattacharyya A, Yanagimachi R. Synthetic organic pH can support fertilization of guinea pig eggs, but not as efflux as bicarbonate buffer. *Gamete Res* 1988; 19:123-129.

Blackmore PF, Neulen J, Lattanzio F, Beebe SJ. Cell surface-binding sites for progesterone mediate calcium uptake in human sperm. *J Biol Chem* 1991; vol 266, No 28; pp.18655-18659.

Blackmore PF, Beebe SJ, Danforth DR, Alexander N. Progesterone and 17 α -hydroxyprogesterone. Novel stimulators of calcium influx in human sperm. *J Biol Chemistry* 1990; Vol.265, no 3:1376-1380.

Blackmore PF, Lattanzio FA. Cell surface localization of a novel non-genomic progesterone receptor on the head of human sperm. *Bioch Biophys Res Commun* 1991; vol. 181, No 1, pp:331-336.

Bleau G, Vandenheuvél WJA, Andersen OF, Gwatkin RBL. Desmosteryl sulfate of hamster spermatozoa, a potent inhibitor of capacitation *in vitro*. *J Reprod Fertil* 1975; 43:175-178.

Bleil JD, Wassarman PM. Autoradiographic visualization of the mouse egg's sperm receptor bound to sperm. *J Cell Biol* 1986; 102:1363-1371.

Bleil JD, Wassarman PM. Sperm-egg interactions in the mouse: Sequence of events and

induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Dev Biol* 1983; 95:317-324.

Bleil JD, Greve JM, Wassarman PM. Identification of a secondary sperm receptor in the mouse egg zona pellucida. Role in maintenance of binding of acrosome-reacted sperm. *Develop Biol* 1988; 128: 376-385.

Bleil JD. Sperm receptors of mammalian eggs. En: *Elements of Mammalian Fertilization*. (Eds.) Wassarman, P.M. Vol.1, Boca Raton, Florida, CRC Press, 1991; pp:133-151.

Blottner S, Nerhing H, Torner H. Individual differences in capacitation of bull spermatozoa by heparin *in vitro*: relationship to fertility. *Theriogenology* 1990; 34:619-628.

Boatman DE. Oviductal modulators of sperm fertilizing ability. In: *Fertilization in mammals*. Eds: Bavister BD, Cummins J, Roldan ERS, Serono Symposia, Norwell, 1990; pp:223-238.

Boatman DE, Andrews, JC, Bavister BD. A quantitative assay for capacitation: evaluation of multiple sperm penetration through the zona pellucida of salt-stored hamster eggs. *Gamete Res* 1988; 19:19-29.

Boatman DE, Robbins RT. Bicarbonate: carbon dioxide regulation of sperm capacitation, hyperactivated motility, and acrosome reaction. *Biol Reprod* 1991, 44:806-813.

Boell EJ. Oxygen consumption of mouse sperm and its relationship to capacitation. *J Exp Zool* 1985; 234:105-116.

Bondioli KR, Wrigth RW. *In vitro* fertilization of pig and sheep oocytes matured *in vitro*. *J Anim Sci* 1983; 57:1006-1012.

Boone WR, Shapiro SS. Quality control in the *in vitro* fertilization laboratory. *Theriogenology* 1990; 33:23-50.

Bork K, Chevrier C, Paquignon M, Jouannet P, Dacheux JL. Analyse de la motilité et du mouvement flagellaire des spermatozoïdes de verrat au cours du transit épидидymaire. *Reprod Nutr Develop* 1988; 28(5):1307-1315.

Brackett BG, Oliphant G. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol Reprod* 1975; 12: 260-274.

Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol Reprod* 1982; 27:147-158.

Brackett BG, Zuelke KA. Analysis of factors involved in the *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology* 1993; 39:43-64.

Bradley MP, Forrester IT. Human and ram seminal plasma both contain a calcium-dependent regulator protein, calsemin. *J Androl* 1982; 3:289-296.

Bradley MP, Forrester IT. Sperm calcium homeostasis during maturation. In: Male Fertility and its Regulation. Eds. Lobl, T.J., Hafez, E.S.E, 1985; pp. 437-449. MIT Press, Boston.

Bragg PW, Handel MA. Protein synthesis in mouse spermatozoa. *Biol Reprod* 1979; 20:333-337.

Brandt H, Hoskins DD. A cAMP-dependent phosphorylated motility protein in bovine epididymal sperm. *J Biol Chem* 1980; 255:982-987.

Brandt H, Acott TS, Johnson DJ, Hoskins DD. Evidence for an epididymal origin of bovine sperm forward motility protein. *Biol Reprod* 1978; 19:830-835.

Breitbart H, Stern B, Rubinstein S. Calcium transport and Ca^{2+} -ATPase activity in ram sperm plasma membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1983; 728: 349-355.

Breitbart H, Lax J, Rotem R, Naor Z. Role of protein kinase C in the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Biochem J* 1992; 281:473-476.

Bunch D, Leyton L, Saling P. Sperm interaction with the zona pellucida: role tyrosine kinase receptor for ZP3 in fertilization. In: *Spermatogenesis-Fertilization-Contraception. Molecular, Cellular and Endocrine Events in Male Reproduction*. Eds. Nieschlag, U.-F. Habenicht. Springer-Verlag, 1992; pp: 367-381.

Burkman LJ, Kruger TF, Coddington CC, Rosenwaks Z, Franken DR, Hodgen GD. The hemizona assay (HZA): development of a diagnostic test for the binding of human spermatozoa to the human hemizona pellucida to predict fertilization potential. *Fertil Steril* 1988; 49:688-697.

Calvete JJ, Sanz L, Töpfer-Petersen E. En: *Spermatogenesis-Fertilization-Contraception. Molecular, Cellular and Endocrine Events in Male Reproduction*. Eds. Nieschlag, U.-F. Habenicht. Springer-Verlag, 1992; pp: 395-417.

Carr DW, Usselman MC, Acott S. Effects of pH, lactate and viscoelastic drag on sperm motility: A species comparison. *Biol Reprod* 1985; 33:588-595.

Carrell DT, Middleton RG, Peterson CM, Jones KP, Urry RL. (1993). Role of the cumulus in the selection of morphologically normal sperm and induction of the acrosome reaction during human in vitro fertilization. *Arch Androl* 1993; 31:133-137.

Clegg EG. Mechanisms of mammalian sperm capacitation. In: *Mechanism and Control of Animal Fertilization*. Ed. J.F. Hartmann, 1983; pp.177-212. Academic Press, New York.

Cooper TG. The onset and maintenance of hyperactivated motility of spermatozoa from the mouse. *Gamete Res* 1984; 9:55-74.

Cooper TG. The epididymis as a site of contraceptive attack. En: *Spermatogenesis-Fertilization-Contraception. Molecular, Cellular and Endocrine Events in Male Reproduction*. Eds. E. Nieschlag, U.-F. Habenicht. Springer-Verlag, 1992; pp:419-460.

- Cooper TG. The Epididymis, Sperm Maturation and Fertilization. Springer-Verlag, Berlin, 1986.
- Cooper GW, Overstreet JW, Katz DF. The motility of rabbit spermatozoa recovered from the female reproductive tract. *Gamete Res* 1979; 2:35-42.
- Cox JF, Avila J, Saravia F, Santa María A. Assessment of fertilizing ability of goat spermatozoa by in vitro fertilization of cattle and sheep intact oocytes. *Theriogenology* 1994; 41:1621-1629.
- Critser ES, Leidfried-Rutledge ML, Northey DL, First, N.L. Influence of cumulus cell association during in vitro maturation of bovine oocytes on embryonic development. *Biol Reprod* 1986b; 34(1):192.
- Critser ES, Leidfried-Rutledge ML, Eyestone WH, Northey DL, First NL. (1986a). Acquisition of developmental competence during maturation in vitro. *Theriogenology* 1986a; 25:150.
- Critser ES, Leibfried-Rutledge, ML, First NL. The effect of semen extension, cAMP and caffeine on in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 1984; 21:625-631.
- Crosby IM, Osborn JC, Moor RM. Follicle cell regulation of protein synthesis and developmental competence in sheep oocytes. *J Reprod Fert* 1981; 62:575-582.
- Cross NL, Morales P, Overstreet JW, Hanson FW. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Gamete Res* 1986; 15:213-226.
- Cross NL, Morales P, Overstreet JW, Hanson FW. Induction of acrosome reactions by the human zona pellucida. *Biol Reprod* 1988; 38:235-244.
- Cross NL, Meizel S. Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biol Reprod* 1989; 41:635-641.
- Cross NL, Morales P, Fukuda M, Behboodi E. Determining acrosomal status of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) sperm by fluorescence microscopy. *Am J Primatol* 1989; 17:157-163.
- Crozet N. La fécondation in vivo et in vitro. En: Thibault, C., Levasseur, M.C. (eds). La reproduction chez les mammifères et l'homme. INRA-Editions Marketing, Paris, 1991b; 315-337.
- Crozet N. Manipulation of oocytes and in-vitro fertilization. *J Reprod Fert* 1991a; Suppl.43:235-243.
- Crozet N. Nucleolar structure and RNA synthesis in mammalian oocytes. *J Reprod Fert* 1989; 38:9-16.
- Crozet, N. Ultrastructural aspects of in vivo fertilization in the cow. *Gamete Res* 1984;

10:241-251.

Crozet N, Théron MC, Chemineau P. Ultrastructure of in vivo fertilization in the goat. *Gamete Res* 1987a; 18:191-199.

Crozet N, Dumont M. The site of acrosome reaction during in vivo penetration of the sheep oocyte. *Gamete Res* 1984; 10:97-105.

Crozet N, Huneau D, De Smedt V, Théron MC, Szöllösi D, Torrès S, Sévellec C. In vitro fertilization with normal development in the sheep. *Gamete Res* 1987b; 16: 159-170.

Crozet N, Kanka J, Motlik J, Fulka J. Nucleolar fine structure and RNA synthesis in bovine oocytes from antral follicles. *Gamete Res* 1986; 14:65-73.

Crozet N, Ahmed-Alí M, Huneau D. Estrous-sheep serum as a potent agent for ovine and caprine IVF. *Proc 12th Inter Congr Anim Reprod* 1992:426-428 .

Crozet N, De Smedt V, Ahmed-Alí M, Sevellec C. Normal development following in vitro oocyte maturation and fertilization in the goat. *Theriogenology* 1993; 39:206.

Cuasnicu PS, Echeverria FG, Piazza A, Blaquier JA. Addition of androgens to cultured hamster epididymus increases zona recognition by immature spermatozoa. *J Reprod Fert* 1984; 70:541-547.

Cummins JM, Yanagimachi R. Development of ability to penetrate the cumulus oophorus by hamster spermatozoa capacitated in vitro, in relation to the timing of the acrosome reaction. *Gamete Res* 1986; 15:187-212.

Cummins JM, Yanagimachi R. Sperm-egg ratios and the site of acrosome reaction during in vivo fertilization in the hamster. *Gamete Res* 1982; 5, 239-256.

Cummins JM. Hyperactivated motility patterns of ram spermatozoa recovered from the oviducts of mated ewes. *Gamete Res* 1982; 6, 53-63.

Chamberlain ME, Dean J. Human homolog of the mouse sperm receptor. *Proc.Nat.Acad.Sci.USA*, 1990; 87:6014-6018.

Chang MC. Fertilizing Capacity of spermatozoa deposited into the Fallopian Tubes. *Nature* 1951; 168:697-698.

Chang MC, Hunter RHF. Capacitation of mammalian sperm: biological and experimental aspects. En: *Handbook of Physiology, Male Reproductive System, sect.7: Endocrinology, vol.5*. Eds. D.W. Hamilton & R.O. Greep. American Physiological Society, Washington, D.C., 1975; pp:339-351.

Chang MC. A detrimental effect of seminal plasma on the fertilizing capacity of sperm. *Nature* 1957; 179 (4553):258-259.

- Chang MC. Fertilization of rabbit ova in vitro. *Nature* 1959; 184:466-467.
- Chauhan MS, Anand SR. In vitro maturation and fertilization of goat oocytes. *Indian J Exp Biol* 1991; 29:105-110.
- Check JH, Katsoff D, Kozak J, Lurie. Effect of swim-up, Percoll and Sephadex sperm separation methods on the hypo-osmotic swelling test. *Human Reprod* 1992; 7(1):109-111.
- Cheng WTK. In vitro fertilization of farm animal oocytes. PhD Thesis, Council of National Academic Awards, Cambridge, U.K., 1985.
- Cheng WTK, Moor RM, Polge C. In vitro fertilization of pig and sheep oocytes matured in vivo and in vitro. *Theriogenology* 1986; 25: 146.
- Cherr GN, Lambert H, Meizel S, Katz DF. In vitro studies of the golden hamster sperm acrosome reaction: Completion on the zona pellucida and induction by homologous solubilized zonae pellucidae. *Dev Biol* 1986; 114:119-131.
- Cherr GN, Dulcibella T. Activation of the mammalian egg: cortical granule distribution, exocytosis, and the block to polyspermy. En: *Fertilization in mammals*. Eds: Bavister BD, Cummins J, Roldan ERS, Serono Symposia, Norwell, 1990; pp:309-330.
- Chian RC, Niwa K, Okuda K. In vitro penetration of zona pellucida of satl-stored bovine oocytes before and after maturation by frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology* 1991; 36:209-219.
- Chian RC, Nakahara H, Niwa K, Funahashi H. Fertilization and early cleavage in vitro of ageing bovine oocytes after maturation in culture. *Theriogenology* 1992; 37:665-673.
- Choi YH, Fukui Y, Ono H. Effects of media and the presence of bovine epithelial cells during in vitro fertilization on fertilizability and developmental capacity of bovine oocytes. *Theriogenology* 1991; 36:863-873.
- Dacheux JL, Chevrier C, Dacheux F, Jeulin C, Gatti JL, Pariset C, Paquignon M. Sperm biochemical changes during epididymal maturation. *Gamete Interactions: Prospects for Immunocontraception*, 1990; pp:111-128.
- Dacheux JL, Paquignon M. Relation between the fertilizing ability, motility and metabolism of epididymal spermatozoa. *Reprod Nutr Dévelop* 1980; 20:1085-1099.
- Dacheux JL, Voglmayr JK. Sequence of sperm cell surface differentiation and its relationship to exogenous fluid proteins in the ram epididymis. *Biol Reprod* 1983; 29:1033-1046.
- Dacheux JL, Chevrier C, Lanson Y. Motility and surface transformations of human spermatozoa during epididymal transit. *Ann NY Acad Sci* 1987; 513:560-563.
- Dacheux JL, Dacheux F, Paquignon M. Changes in sperm surface membrane and luminal protein fluid content during epididymal transit in the boar. *Biol Reprod* 1989; 40:635-651.

- Dacheux JL, Paquignon M, Combarous Y. Head-to-head agglutination of ram and boar epididymal spermatozoa and evidence for an epididymal antagglutinin. *J Reprod Fert* 1983; 67:181-189.
- Dalhausen RD, Bonham JB, Meyers G, Luswick TM. Characterization and maturation of prepuberal calf follicular oocytes *in vitro*. *Theriogenology* 1981; 15:111.
- Dasgupta S, O'Toole C, Mills CL, Fraser LR. Pentoxifylline and progesterone promote capacitation and acrosomal exocytosis in human spermatozoa. *J Reprod Fertil Abstract series* 1993; No. 11, 53 (Abs.96).
- Davis BK. Inhibition of fertilizing capacity in mammalian spermatozoa by natural and synthetic vesicles. *Am Oil Chem Soc Monograph* 1978; 5:145-158.
- Davis BK, Byrne R, H?ngund B. Studies on the mechanism of capacitation. II. Evidence for lipid transfer between plasma membrane of the rat sperm and serum albumin during capacitation *in vitro*. *Biochim Biophys Acta* 1979; 558:257-266.
- Davis BK, Byrne R, Bedigian K. Studies on the mechanism of capacitation: Albumin-mediated changes in plasma membrane lipids during *in vitro* incubation of rat sperm cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980; 77: 1546-1550.
- Davis BK. Timing of fertilization in mammals: Sperm cholesterol/phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981; 78: 7560-7564.
- Davis BK. Uterine fluid proteins bind sperm cholesterol during capacitation in the rabbit. *Experientia* 1982; 38:1063-4.
- Daya S, Gwatkin RBL, Bissessar H. Separation of motile human spermatozoa by means of glass bead column. *Gamete Res* 1987; 17:375-380.
- de Curtis I, Fumagalli G, Borgese N. Purification and characterisation of two plasma membrane domains from ejaculated bull spermatozoa. *J Cell Biol* 1986; 102:1813-1825.
- Demott RP, Suarez SS. Hyperactivated sperm progress in the mouse oviduct. *Biol Reprod* 1992; 46:779-785.
- De Smedt V, Crozet N, Ahmed-Ali M, Martino A, Cognié Y. *In vitro* maturation and fertilization of goat oocytes. *Theriogenology* 1992; 37:1049-1060.
- Didion B, Graves C. *In vivo* capacitation and acrosome reaction of bovine sperm in estrous and diestrous cows. *J Anim Sci* 1986; 62:1029-1033.
- Didion BA, Dobrinsky JR, Giles JR, Graves CN. Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. *Gamete Res* 1989; 22:51-57.
- Dow MPD, Bavister BD. Direct contact is required between serum albumin and hamster spermatozoa for capacitation *in vitro*. *Gamete Res* 1989; 23: 171-180.

- Dravland JE, Meizel S. The effect of inhibitors of trypsin and phospholipase A₂ on the penetration of zona pellucida-free hamster eggs by acrosome-reacted hamster sperm. *Andrologia* 1982; 3:388-395.
- Dravland JE, Llanos MN, Munn RJ, Meizel S. Evidence for the involvement of a sperm trypsin-like enzyme in the membrane events of the hamster sperm acrosome reaction. *J Exp Zool* 1984; 232, 117-128.
- Dudenhause E, Talbot P. Detection and kinetics of the normal acrosome reaction of mouse sperm. *Gamete Res* 1982; 6:257-265.
- Dunbar BS, Budkiewicz AB, Bundman, DS. Proteolysis of specific porcine zona pellucida glycoproteins by boar acrosin. *Biol Reprod* 1985; 32:619-630.
- Ebensperger C, Barros C. Changes at the hamster oocyte surface from the germinal vesicle stage to ovulation. *Gamete Res* 1984; 19:387-397.
- Eberspächer U, Donner P. Characterization of inhibitory and stimulatory effects of zona pellucida glycoproteins on the proacrosin/acrosin system. En: *Spermatogenesis-Fertilization-Contraception. Molecular, Cellular and Endocrine Events in Male Reproduction*. Eds. Nieschlag, U.-F. Habenicht. Springer-Verlag, 1992; pp: 383-394.
- Eddy EM. The spermatozoa. In: *The Physiology of Reproduction*, vol.1. pp.27-68. Eds. E. Knobil & J.D. Neill. Raven Press, New York, 1988.
- Ehrenwald E, Parks JK, Foote RH. Cholesterol efflux from bovine sperm: I. Induction of the acrosome reaction with lysophosphatidylcholine after reducing sperm cholesterol. *Gamete Res* 1988; 20:145-157.
- Ehrenwald E, Foote RH, Parks JE. Cholesterol efflux from bovine sperm: bovine oviductal fluid components and their potential role in sperm cholesterol efflux. (Abstract). *J Androl* 1989; 10, 21.
- El-Gaafary MN, Daader AH, Ziedan A. Effects of caffeine on bull semen quality and sperm preparation into cervical mucus. *Anim Reprod Sci* 1990; 23:13-19.
- Ellington JE, Igotz GG, Miller PG, Currie WB, Meyers-Wallen VN. Oviduct epithelial cell co-culture modifies stallion and bull sperm cell surface proteins. *Biol Reprod* 1993; 48(1):107 (Abs. 196).
- Ellington JE, Padilla AW, Vredenburgh WL, Dougherty EP, Foote RH. Behaviour of bull spermatozoa in bovine uterine tube epithelial cell co-culture: An in vitro model for studying the cell interactions of reproduction. *Theriogenology* 1991; 35(5):977-989.
- Ellington JE, Vredenburgh WL, Padilla AW, Foote RH. Acrosome reaction of sperm in bovine oviduct cell coculture. *J Reprod Fert* 1989; 86, Abstract series No.3:46 (Abs.82).
- Ellington JE, Blue BJ, Miller PG, Ball BA. Uterine tube (oviduct) epithelial cell culture

- systems for in vitro capacitation of stallion spermatozoa. *Theriogenology* 1992; 37(1):207.
- Eng LA, Oliphant G. Rabbit sperm reversible decapacitation by membrane stabilization with a highly purified glycoprotein from seminal plasma. *Biol Reprod* 1978; 19:1083-1094.
- Englert Y, Van der Bergh M, Rodesch C, Bertrand E, Biramane J, Legreve A. Comparative auto-controlled study between swim-up and Percoll preparation of fresh semen samples for in-vitro fertilization. *Human Reprod* 1992; 7(3):399-402.
- Ericsson RJ. Isolation and storage of progressive motile human sperm. *Andrologia* 1977; 9:111-114.
- Estienne MJ, Knight JW, Beal WE. Isolation of a population of intact highly motile porcine spermatozoa using a discontinuous bovine serum albumin gradient. *Theriogenology* 1988; 29:771-778.
- Evans RW, Weaver DE, Clegg ED. Effects of in utero and in vitro incubation on the lipid-bound fatty acids and sterols of porcine spermatozoa. *Gamete Res* 1987; 18:153-162.
- Eyestone WH, First NL. Variation in bovine embryo development in vitro due to bulls. *Theriogenology* 1989; 31:191.
- Farooqui AA. Biochemistry of sperm capacitation. *Int J Biochem* 1983; 15:463-468.
- Fayed AH, Hattab SA. Effect of theophylline on motility of bull spermatozoa in vitro. *Assiut Veterinary Medical J* 1991; 25:225-229.
- Fazeli AR, Steeneweg W, Bevers M, Colenbrander B. Sperm-zona binding in the bovine is not influenced by the day to day variations in ejaculates. *J Reprod Fert* 1992; Abstract series No. 10:19.
- Fazeli AR, Steeneweg W, Bevers M, de Loos F, Colenbrander B. Sperm-zona binding: an additional parameter to assess quality of bull semen?. *J Reprod Fert* 1991; Abstract series No. 8:30.
- Ferrandi B, Cremonesi F, Porcelli F. Microphotometric measurement of some enzymatic activities in rabbit spermatozoa during epididymal maturation. *Anim Reprod Sci* 1987; 13:211-220.
- First NL, Parrish JJ. In-vitro fertilization of ruminants. *J Reprod Fert* 1987; Suppl.34:151-165.
- Flaherty SP, Swann NJ. Proteases are not involved in the membrane fusion events of lysolecithin-mediated guinea pig sperm acrosome reaction. *J Cell Sci* 1993; 104, 163-172.
- Flechon JE, Hunter RHF. Distribution of spermatozoa in the utero-tubal junction and isthmus of pigs, and their relationship with the luminal epithelium after mating: a scanning electron microscope study. *Tissue & Cell* 1981; 13, 127-139.

Fleming AD, Yanagimachi R. Fertile life of acrosome-reacted guinea-pig spermatozoa. *J Exp Zool* 1982; 220:109-115.

Florman HM, Tombes RM, First NL, Babcock DF. An adhesion-associated agonist from the zona pellucida activates G protein-promoted elevations of internal Ca^{2+} and pH that mediate mammalian sperm acrosomal exocytosis. *Dev Biol* 1989; 135:133-146.

Florman HM, Babcock DF. Changes in intracellular $[Ca^{2+}]$ and pH accompany the zona pellucida-induced acrosome reaction of bovine spermatozoa. *Biol Reprod* 1988; 38 (suppl.):60.

Florman HM, Corron ME, Kim TDH, Babcock DF. Activation of voltage-dependent calcium channels of mammalian sperm is required for zona pellucida-induced acrosomal exocytosis. *Dev Biol* 1992; 152:304-314.

Florman HM, Wassarman PM. O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity. *Cell* 1985; 41:313-324.

Fournier-Delpech S, Colas G, Courot M, Ortavant R, Brice G. Epididymal sperm maturation in the ram: Mobility, fertilizing ability and embryonic survival after uterine artificial insemination in the ewe. *Ann Biol Anim Biochem Biophys* 1979; 19:597-605.

Fournier-Delpech S, Thibault C. Acquisition de la fécondance du spermatozoïde. En: Thibault, C., Levasseur, M.C. (eds). *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. INRA-Editions Marketing, Paris, 1991; pp.251-272.

Fournier-Delpech S, Thibault C. Acquisition of sperm fertilizing ability. In: *Reproduction in mammals and man*. Eds. Thibault, C., Levasseur, M.C., Hunter, R.H.F., Ellipses, Paris, 1993. pp. 257-279.

Fraser LR. Potassium ions modulate expression of mouse sperm fertilizing ability, acrosome reaction and whiplash motility in vitro. *J Reprod Fert* 1983; 69:539-553.

Fraser L. p-Aminobenzamidine, an acrosin inhibitor, inhibits mouse sperm penetration of the zona pellucida but not the acrosome reaction. *J Reprod Fert* 1982; 65: 185-194.

Fraser LR, Umar G, Sayed S. Na^+ -requiring mechanisms modulate capacitation and acrosomal exocytosis in mouse spermatozoa. *J Reprod Fert* 1993; 97, 539-549.

Fraser LR. Dibutyryl cyclic AMP decreases capacitation time in vitro in mouse spermatozoa. *J Reprod Fert* 1981; 62:63-72.

Fraser LR. Adenosine and its analogues, possibly acting at A_2 receptors, stimulate mouse sperm fertilizing ability during early stages of capacitation. *J Reprod Fert* 1990b; 89:467-476.

Fraser LR. Ca^{2+} is required for mouse sperm capacitation and fertilization in vitro. *J Androl* 1982; 3:412-419.

Fraser LR. Minimum and maximum extracellular Ca^{2+} requirements during mouse sperm

capacitation and fertilization in vitro. *J Reprod Fert* 1987; 81:77-89.

Fraser LR. Mechanisms controlling mammalian fertilization. In: *Oxford Reviews of Reproductive Biology*. Ed. Clarke, J.R., Oxford University Press, 1984; vol.6, pp.174-225.

Fraser, LR. Sperm capacitation and its modulation. In: *Fertilization in mammals*. Eds: Bavister BD, Cummins J, Roldan ERS, Serono Symposia, Norwell, 1990a; pp:141-153.

Fraser LR, Quinn PJ. A glycolytic product is obligatory for induction of acrosome reaction and whiplash motility required for fertilization in the mouse. *J Reprod Fert* 1981; 61:25??.

Fraser LR, McIntyre K. Calcium channel antagonists modulate the acrosome reaction but not capacitation in mouse spermatozoa. *J Reprod Fert* 1989; 86:223-233.

Fraser LR, McDermott CA. Ca^{2+} -related changes in the mouse sperm capacitation state: a possible role for Ca^{2+} -ATPase. *J Reprod Fert* 1992; 96:363-377.

Fraser LR, Harrison RAP, Herod JE. Characterization of a decapacitation factor associated with epididymal mouse spermatozoa. *J Reprod Fert* 1990; 89, 135-148.

Fraser LR, Ahuja KK. Metabolic and surface events in fertilization. *Gamete Res* 1988; 20:491-519.

Fraser LN. Sequence of ionic changes involved in initiation of mouse sperm acrosomal exocytosis: a pivotal role for Ca^{2+} channels. *J Reprod Fert* 1992; Abstract series No 10, p:18

Friess AE, Töpfer-Petersen E, Schill WB. Fracture labelling of boar spermatozoa for fucosa binding protein (FBP). *Histochemistry* 1987; 87:181-183.

Fukui Y. Effect of follicle cells on the acrosome reaction, fertilization, and developmental competence of bovine oocytes matured in vitro. *Molecular Reprod Develop* 1990; 26:40-46.

Fukui Y, Fukushima M, Ono H. Fertilization in vitro of bovine oocytes after various sperm procedures. *Theriogenology* 1983a; 20(6):651-660.

Fukui Y, Ono H. In vitro development to blastocyst of in vitro matured and fertilized bovine oocytes. *Vet Record* 1988; 122:282.

Fukui Y, Ono H. Effects of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for in vitro maturation, fertilization, cleavage and development of bovine embryos. *J Reprod Fert* 1989; 86:501-506.

Fukui Y, Fukushima M, Ono H. Fertilization and cleavage of bovine follicular oocytes in rabbit reproductive tracts after maturation in vitro. *J Exp Zool* 1983; 226:137-142.

Fukui Y, Sonoyama T, Mochizuki H, Ono H. Effects of heparin dosage and sperm capacitation time on in vitro fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 1990; 34:579-591.

- Gaddum, P. Sperm maturation in the male reproductive tract: development of motility. *Anat Rec* 1968; 161:471-482.
- Gaddum-Rosse P. Mammalian gamete interactions: What can be gained from observations on living eggs? *Am J Anat* 1985; 173:347-356.
- Gadella BM. Ph D. Thesis, University of Utrecht, 1994.
- Galli C, Moor RM. Gonadotropin requirements for the in vitro maturation of sheep oocytes and their subsequent embryonic development. *Theriogenology* 1991; 35:1083-1093.
- Garbers DL, Kopf GS. The regulation of spermatozoa by calcium and cyclic nucleotides. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 1980; 13:251-306.
- Garbers DL, First NL, Sullivan JJ, Lardy HA. Stimulation and maintenance of ejaculated bovine spermatozoan respiration and motility by caffeine. *Biol Reprod* 1971; 5:336-339.
- Garde J, García Artiga C, Gutiérrez A, Vázquez I. Triple tinción para valorar acrosomas normales y viabilidad espermática en semen ovino. *Med Vet* 1992; 9(2):107-113.
- Gaunt SJ. Spreading of a sperm surface antigen within the plasma membrane of the egg after fertilization in the rat. *J Embryol Exp Morphol* 1983; 75:259-270.
- Gellert-Mortimer ST, Clark GN, Baker WG, Hyne RV, Johnston WIH. Evaluation of nycodenz and Percoll density gradients for selection of motile human spermatozoa. *Fert Steril* 1988; 49:335-341.
- Goldman EE, Ellington JE, Farrell PB, Foote RH. Use of fresh and frozen-thawed bovine oviduct cells for acrosome reacting fresh and frozen-thawed bull sperm in vitro. *Theriogenology* 1991; 35(1):204.
- Gordon I. In vitro maturation (IVM) and in vitro fertilization (IVF) of cattle ova. *Embryo Transfer Newsletter* 1990; 8:6-11.
- Gordon I. Laboratory production of cattle embryos. CAB International. University Press, Cambridge, 1994.
- Gordon LM Mobley, PW. Membrane lipids, membrane fluidity, and enzyme activity. In: *Membrane Fluidity in Biology*, Vol. 4, edited Aloia RC, Boggs JM, Academic Press, Orlando. 1985; pp 1-49.
- Gorus FK, Pipeleers DG. A rapid method for the fractionation of human spermatozoa according to their progressive motility. *Fert Steril* 1981; 35:662-665.
- Goto K, Kajihara Y, Koba M, Kosaka S, Nakanishi Y, Ogawa K. In vitro fertilization and development of in vitro matured bovine follicular oocytes. *J Anim Sci* 1989; 67:2181-2185.
- Gould KG, Young LG, Hinton BT. Alteration in surface charge of chimpanzee sperm during

epididymal transit and at ejaculation. *Arch Androl* 1984; 6:20-24.

Graham JK. Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process. *Theriogenology* 1994; 41:1151-1162.

Graham JK, Foote RH, Hough SR. Penetration of zona-free hamster eggs by liposome-treated sperm from the bull, ram, stallion, and boar. *Biol Reprod* 1987; 37:181-188.

Graham JK, Foote RH, Parrish JJ. Effect of dialuroylphosphatidyl-choline on the acrosome reaction and subsequent penetration of bull spermatozoa into zona-free hamster eggs. *Biol.Reprod* 1986; 35:413-424.

Graham JK, Foote RH. Dialuroylphosphatidylcholine liposome effects on the acrosome reaction and in vitro penetration of zona-free hamster eggs by bull sperm: I. A fertility assay for fresh semen. *Gamete Res* 1987a; 16: 133-145.

Graham JK, Kunze E, Hammerstedt RH. Analysis of sperm viability, acrosomal integrity and mitochondrial function using flow cytometry. *Biol Reprod* 1990; 42:55-64.

Graham JK, Foote RH. Dialuroylphosphatidylcholine liposome effects on the acrosome reaction and in vitro penetration of zona-free hamster eggs by bull sperm: II. A fertility assay for frozen-thawed semen. *Gamete Res* 1987b; 16: 147-158.

Green DPL. The induction of the acrosome reaction in guinea-pig sperm by the divalent metal cation ionophore A23187. *J Cell Sci* 1978; 32:137-151.

Greve T, Xu KP, Callesen H, Hyttel P. In vivo development of in vitro fertilized bovine oocytes matured in vivo versus in vitro. *J In Vitro Fert Embryo Transfer* 1987; 4:281-285.

Greve T, Madison V. In vitro fertilization in cattle: a review. *Reprod Nutr Dev* 1991; 31:147-157.

Grimek HJ, Bellin ME, Ax RL. Characteristics of proteoglycans isolated from small and large bovine ovarian follicles. *Biol.Reprod* 1984; 30:397-409.

Guerin JF, Mathieu C, Lornage J, Pinatel MC, Bouliou D. Improvement of survival and fertilizing capacity of human spermatozoa in an IVF programme by selection on discontinuous Percoll gradients. *Hum Reprod* 1989; 4:798-804.

Guyader C, Chupin D. Capacitation of fresh bovine spermatozoa on bovine epithelial oviduct cell monolayers. *Theriogenology* 1991; 36(3):505-512.

Guyader C, Procureur R, Chupin D. Capacitation of fresh bovine sperm on oviductal cell monolayer. 5th Scientific Meeting AETE, Lyon 1989; p.156 Abstr.

Guyader C, Marquant-Le Guienne B, Humblot P, Thibier M. Effect of heparin concentration on in vitro development of bovine eggs. Proc. 6th. European Embryo Transfer. Assoc. Lyon

1990; 150.

Gwatkin RBL, Williams DT. Receptor activity of the hamster and mouse solubilized zona pellucida before and after the zona reaction. *J.Reprod.Fert* 1977; 49:55-59.

Gwatkin RBL. *Fertilization Mechanisms in Mann and Mammals*. Plenum. New York. 1977.

Gwatkin RBL. En: J.Dietl (Ed.) *The mammalian Egg coat*. Springer-Verlag 1989; pp: 61-74.

Gyllensten U, Wharton D, Josefsson A, Wilson AC. Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. *Nature* 1991; 352:255-257.

Hammerstedt RH, Hay SR, Amann RP. Modification of ram sperm membranes during epididymal transit. *Biol Reprod* 1982; 27:745-754.

Hanada A. In vitro fertilization in goat. *Jpn J Anim Reprod* 1985a; 31:21-26.

Hanada A. In vitro fertilization in cattle with particular reference to sperm capacitation by ionophore A23187. *Jpn J Anim Reprod* 1985b; 31:56-61.

Hafez ESE.
1989:

Hancock JL. A staining technique for the study of temperature shock in semen. *Nature* 1951; 167:323-324.

Handrow RR, Lenz RW, Ax RL. Structural comparisons among glycosaminoglycans to promote an acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 107:1326.

Handrow RR, Boehm SK, Lenz RW, Robinson JA, Ax RL. Specific binding of the glycosaminoglycans ³H-heparin to bull, monkey, and rabbit spermatozoa in vitro. *J Androl* 1984; 5:51-63.

Handrow RR, Parrish JJ, First NL. Heparin stimulates calcium uptake by bovine sperm in vitro. *J Androl* 1986; 7:23.

Hansen C, Srikandakumar A, Downey BR. Presence of follicular fluid in the porcine oviduct and its contribution to the acrosome reaction. *Molecular Reprod Develop* 1991; 30:148-153.

Harper MJK. Sperm and egg transport. En: *Reproduction in mammals: Germ cells and fertilization*. (2nd edition). Eds. CR Austin & RV Short. Cambridge University Press. 1987; Vol.1,pp:102-127.

Harrison WE, Fraser LR. Is an influx of extracellular K⁺ required for acrosomal exocytosis in capacitated mouse spermatozoa?. *J Reprod Fert* 1993; Abstract series No 11; p:23.

Harrison RAP, White IG. Some methods for washing spermatozoa from bull, boar and ram:

- a comparison using biochemical and other criteria. *J Reprod Fert* 1972; 29:271-284.
- Harrison RAP. A highly efficient method for washing mammalian spermatozoa. *J Reprod Fert* 1976; 48:347-353.
- Hartmann JF. Mammalian fertilization: gamete surface interactions in vitro. En: Mechanism and control of animal fertilization. Ed Hartmann JF, Academic Press, New York. 1985; pp:325-364.
- Helm G, Owman CH, Rosengren E, Sjoberg NO. Regional and cyclic variations in catecholamine concentrations of the human Fallopian tube. *Biol Reprod* 1982; 26:553-558.
- Hillery FL, Parrish JJ, First NL. Bull specific effect on fertilization and embryo development in vitro. *Theriogenology* 1990; 33:249.
- Hiraoka J, Hirao Y. Fate of sperm tail components after incorporation into hamster egg. *Gamete Res* 1988; 19:369-380.
- Holm P, Irvine B, Armstrong DT, Seamark RF. In vitro production of sheep blastocysts from IVM-oocytes using frozen semen and oviduct epithelial cell co-culture for IVF. *Theriogenology* 1991; 35(1):214.
- Holt WV, North RD. Thermotropic phase transitions in the plasma membrane of spermatozoa. *J Reprod Fert* 1986; 78:447-457.
- Holt WV. Membrane heterogeneity in the mammalian spermatozoa. *Int Rev Cytol* 1984; 87:159-194.
- Holt WV. Surface-bound sialic acid on ram and bull spermatozoa: Deposition during epididymal transit and stability during washing. *Biol Reprod* 1980; 23:847-857.
- Hoppe PC, Pitts S. Fertilization in vitro development of mouse ova. *Biol Reprod* 1973; 8:420-426.
- Hoskins DD, Brandt H, Acott TS. Initiation of sperm motility in the mammalian epididymis. *Fed Proc Fed Am Soc Exp Biol* 1978; 37:2534-2542.
- Huang TTF, Flemming AD, Yanagimachi R. Only acrosome-reacted spermatozoa can bind and penetrate into zona pellucida: A study using guinea pig. *J Exp Zool* 1981; 217:286-290.
- Huneau D, Crozet N. In vitro fertilization in the sheep: Effect of elevated calcium concentration at insemination. *Gamete Res* 1989; 23:119-125.
- Hunter RHF. Peri-ovulatory physiology of the oviduct, with special reference to progression, storage and capacitation of spermatozoa. In: *New Horizons in Sperm Cell Research* 1987a; pp.31-45. Ed. H.Mohri, Japan Sci. Soc. Press, Tokyo.
- Hunter RHF, Nichol, R. Transport of spermatozoa in the sheep oviduct: preovulatory

- sequestering of cells in the caudal isthmus. *J Exp Zool* 1983; 28, 121-128.
- Hunter RHF, Fléchon B, Fléchon JE. Distribution, morphology and epithelial interactions of bovine spermatozoa in the oviduct before and after ovulation: a scanning electron microscope study. *Tissue and Cell* 1991; 23(5) 641-656.
- Hunter RHF. Pre-ovulatory arrest and peri-ovulatory redistribution of competent spermatozoa in the isthmus of the pig oviduct. *J Reprod Fert* 1984; 72, 203-211.
- Hunter RHF. Human fertilization in vivo, with special reference to progression, storage and release of competent spermatozoa. *Human Reprod* 1987b; 2,329-332.
- Hunter RHF. Capacitation potential of the Fallopian tube: a study involving surgical insemination and subsequent incidence of polyspermy. *Gamete Res* 1988b; 21:255-266.
- Hunter RHF. Transport of gametes, selection of spermatozoa and gamete lifespan in the female tract. In: *The Fallopian Tubes* 1988a; pp. 53-80. Ed. R.H.F. Hunter. Springer-Verlag, New York.
- Hyne RV, Higginson RE, Kohlman D, Lopata A. Sodium requirement for capacitation and membrane fusion during the guinea pig sperm acrosome reaction. *J Reprod Fert* 1984; 70:83-94.
- Hyne RV, Edwards KP. Influence of 2-deoxyl-D-glucose and energy substrates on guinea pig sperm capacitation and acrosome reaction. *J Reprod Fert* 1985; 73:59-69.
- Hyne RV, Edwards KP, Lopata A, Smith JD. Changes in guinea pig sperm intracellular sodium and potassium content during capacitation and treatment with monovalent ionophores. *Gamete Res* 1985; 12: 65-73.
- Hyttel P, Xu KP, Smith S, Callesen H, Greve T. Ultrastructure of the final nuclear maturation of bovine oocytes in vitro. *Anat Embryol* 1987; 176:35-40.
- Hyttel P, Greve T, Callesen H. Ultrastructural of in-vitro fertilization in superovulated cattle. *J Reprod Fert* 1988; 82:1-13.
- Hyttel P, Callesen H, Greve T, Schmidt M. Oocyte maturation and sperm transport in superovulated cattle. *Theriogenology* 1991; 35:91-107.
- Ijaz A, Hunter AG. Evaluation of TEST-yolk sperm capacitation system for use in bovine in vitro fertilization. *J Dairy Sci* 1992; 75:394-398.
- Ijaz, A, Hunter AG. Effect of washing and capacitating media pH on bull sperm motility, acrosome integrity, and ability to penetrate zona-free hamster oocytes. *J Dairy Sci* 1989c; 72:2691-2699.
- Ijaz A, Hunter AG. Evaluation of TEST-yolk buffer capacitated sperm for use in bovine in vitro fertilization. *Biol Reprod* 1989b; 40(1):147 (Abs.298).

- Ijaz A, Hunter AG. Induction of bovine sperm capacitation by TEST-yolk semen extender. *J Dairy Sci* 1989a; 72:2683-2690.
- Ing RMY, Li DQ, Harding AM, Jones WR. A comparison of swim-down and swim-up methods for the extraction of high motility sperm. *Fert Steril* 1991; 55:817-819.
- Iritani A, Kasai M, Niwa K, Song HB. Fertilization in vitro of cattle follicular oocytes with ejaculated spermatozoa capacitated in a chemically defined medium. *J Reprod Fertil* 1984; 70:487-492.
- Iritani A, Utsumi K, Miyake M, Yamaguchi Y. Individual variation in the in vitro fertilizing ability of bull spermatozoa. *Dev Growth Diff* 1986; 28:439.
- Irvine DS, Aitken RJ. Measurement of intracellular calcium in human spermatozoa. *Gamete Res* 1986; 15:57-71.
- Ishijima S. Changes in the beating pattern of spermatozoa during maturation and capacitation. En: *Fertilization in mammals*. Eds: Bavister BD, Cummins J, Roldan ERS, Serono Symposia, Norwell, 1990; pp:101-110.
- Iwamatsu T, Chang MC. Factors involved in the fertilization of mouse eggs in vitro. *J Reprod Fert* 1971; 26:197-208.
- Jansen RPS. Fallopian tube isthmic mucus and ovum transport. *Science* 1978; NY 201, 349-351.
- Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fert* 1984; 70:219-228.
- Johnson MH, Everitt BJ. Coitus and fertilization. En: *Essential Reproduction*. Blackwell Scientific Publications Ltd., 1988; pp:201-223.
- Jones R, Brown CR, Lancaster RT. Carbohydrate-binding properties of boar sperm proacrosin and assessment of its role in sperm-egg recognition and adhesion during fertilization. *Development* 1988; 102, 781-792.
- Jones RC, Holt WV. The effects of washing on the ultrastructure and cytochemistry of ram spermatozoa. *J Reprod Fert* 1974; 41:159-167.
- Jones R, Shalgi R, Hoyland J, Phillips DM. Topographical rearrangement of a plasma membrane antigen during capacitation of rat spermatozoa in vitro. *Dev Biol* 1990; 139, 349-362.
- Jones R, Brown CR, Von Glos KI, Gaunt SJ. Development of a maturation antigen on the plasma membrane of rat spermatozoa in the epididymis and its fate during fertilization. *Exp Cell Res* 1981; 156:31-44.
- Joyce C, Jeyendran RS, Zaneveld LJD. Release, extraction and stability of hyaluronidase

- associated with human spermatozoa: comparison with rabbit. *J Androl* 1985; 6:152-161.
- Juneja SC, Swanson RJ, Roudebush WE, Dodson MG. Routine human sperm function analysis and the sperm hypo-osmotic swelling test. *Biol Reprod* 1989; 40(1):115.
- Katz DF, Yanagimachi R. Movement characteristics of hamster spermatozoa within the oviduct. *Biol Reprod* 1980; 22:759-764.
- Katz D, Drobnis E, Overstreet J. Factors regulating mammalian sperm migration through the female reproductive tract and oocyte vestments. *Gamete Res* 1989; 22:443-469.
- Katz DF, Drobnis EZ. Analysis and interpretation of the forces generated by spermatozoa. En: *Fertilization in mammals*. Eds: Bavister BD, Cummins J, Roldan ERS, Serono Symposia, Norwell, 1990; pp:125-137.
- Kay VJ, Coutts JRT, Robertson L. Pentoxifylline stimulates hyperactivation in human spermatozoa. *Human Reprod* 1993; 8:727-731.
- Kay VJ, Coutts JRT, Robertson L. Effects of pentoxifylline and progesterone on human spermatozoa. *J Reprod Fert* 1993; Abstract series n° 11:54 (97).
- Keefer CL, Brackett BG, Troop CG. Bovine fertilization after in vitro insemination with motile sperm fractions. *Theriogenology* 1985; 23:198.
- Keskintepe L, Darwish GM, Kenimer AT, Brackett BG. Term development of caprine embryos derived from immature oocytes in vitro. *Theriogenology* 1994; 42:527-535.
- Koehler JK, Nudelman ED, Hakomori S. A collagen-binding protein of the surface of ejaculated rabbit spermatozoa. *J Cell Biol* 1980; 86, 529-536.
- Koehler JK, Gaddum-Rose P. Media induced alterations of the membrane associated particles of the guinea pig sperm tail. *J Ultrastruct Res* 1975; 51,106-118.
- Kopf GS. The zona pellucida-induced acrosome reaction: a model for sperm signal transduction. En: *Fertilization in mammals*. Eds: Bavister BD, Cummins J, Roldan ERS, Serono Symposia, Norwell, 1990; pp:253-266.
- Kopf GS, Gerton GL. The mammalian sperm acrosome and the acrosome reaction. In: *Elements of mammalian fertilization*. Eds. Wassarman PM, Vol.1, CRC Press, Boca Raton, 1991; pp 153-203.
- Kusunoki H, Yasui T, Kato S, Kanda S. Identification of acrosome-reacted goat spermatozoa by a simplified triple-stain technique. *Jpn J Zootech Sci* 1984; 55(11):832-837.
- Kusunoki H, Sakaue M, Kato S, Kanda S. Induction of the acrosome reaction in ejaculated goat spermatozoa by preincubation in chemically defined medium. *J Exp Zool* 1989; 249 pg??
- Kuzan FB, Flemming AD, Seidel GE. Successful fertilization in vitro of fresh intact oocytes

by perivitelline (acrosome-reacted) spermatozoa of the rabbit. *Fertil Steril* 1984; 41:766-770.

Lalumiere G, Bleau G, Chapdelaine A, Roberts KD. Cholesteryl sulfate and sterol sulfate in the human reproductive tract. *Steroids* 1976; 27:247-260.

Langlais J, Kan FWK, Granger L, Raymond L, Bleau G, Roberts KD. Identification of sterol acceptors that stimulate cholesterol efflux from human spermatozoa during in vitro capacitation. *Gamete Res* 1988; 20:185-201.

Langlais J, Zollinger M, Plante L, Chapdelaine A, Bleau G, Roberts KD. Localization of cholesteryl sulfate in human spermatozoa in support of a hypothesis for the mechanism of capacitation. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 1981; 78: 7266-7270.

Langlais J, Roberts KD. A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete Res* 1985; 12: 183-224.

Larsson B, Shamsuddin M, Rodriguez-Martinez H. In vitro oocyte maturation and fertilization in the bovine. *Reprod Domes Anim* 1993; 28:161-163.

Lathorp WF, Carmichael EP, Myles DG, Primakoff P. cDNA cloning reveals the molecular structure of a sperm surface protein, PH-20, involved in sperm-egg adhesion and the wide distribution of its gene among mammals. *J Cell Biol* 1990; 111:2939-2949.

Leclerc P, Sirard MA, Chafouleas JG, Lambert RD. Decrease in calmodulin concentrations during heparin-induced capacitation in bovine spermatozoa. *J Reprod Fert* 1992; 94:23-32.

Lechtzin N, Garside W, Heyner S, Hillman N. Glass-bead column separation of motile and non-motile human spermatozoa. *J In Vitro Fert Embryo Transfer* 1991; 8:96-100.

Lee MA, Storey BT. Influx of Ca^{2+} is the primary reaction mediating the first stage of zona induced acrosome reaction in mouse spermatozoa. *Biol Reprod* 1988; 38 (suppl.):93.

Lee CN, Ax RL. Concentrations and composition of glycosaminoglycans in the female bovine reproductive tract. *J Dairy Sci* 1984; 67:2006-2009.

Lee CN, Clayton MK, Bushmeyer SM, First NL, Ax RL. Glycosaminoglycans in ewe reproductive tracts and their influence on acrosome reactions in bovine spermatozoa in vitro. *J Anim Sci* 1986; 63:861-867.

Legault Y, Bleau G, Chapdelaine A, Roberts KD. Steroid sulfatase activity of the hamster reproductive tract during the estrous cycle. *Biol Reprod* 1980; 23:720-725.

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

Legendre LM, Stewart-Savage J. Effect of cumulus maturity on sperm penetration in the golden hamster. *Biol Reprod* 1993; 49: 82-88.

- Leibfried ML, Bavister BD. Effects of epinephrine and hypotaurine on in vitro fertilization in the golden hamster. *J Reprod Fert* 1982; 66: 87-93.
- Leibfried ML, Bavister BD. The effects of taurine and hypotaurine on in vitro fertilization in the golden hamster. *Gamete Res* 1981; 4:57-63.
- Leibfried L, First NL. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *J Anim Sci* 1979; 48:76-86.
- Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Parrish JJ, First NL. In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 1989; 31:61-73.
- Leidfried-Rutledge ML, Crister ES, First NL. Fertilization potential of follicular oocytes classified by stage of cycle and size of follicle. *Theriogenology* 1985; 23:705-709.
- Leidfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH, Northey DL, First NL. Development potential of bovine oocytes matured in vitro or in vivo. *Biol Reprod* 1987; 36:376-383.
- Le Lannou D, Blanchard Y. Nuclear maturity and morphology of human spermatozoa selected by Percoll density gradient centrifugation or swim-up procedure. *J Reprod Fert* 1988; 84:551-556.
- Lenz RW, Ax RL, Grimek HJ, First NL. Proteoglycan from bovine follicular fluid enhances an acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 106(4):1092-1098.
- Lenz RW, Ball GD, Leibfried ML, Ax RL, First NL. In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature-dependent processes. *Biol Reprod* 1983b; 29:173-179.
- Lenz RW, Bellin ME, Ax RL. Rabbit spermatozoa undergo an acrosome reaction in the presence of glycosaminoglycans. *Gamete Res* 1983a; 8:11-19.
- Lessley BA, Garner DL. Isolation of motile spermatozoa by density gradient centrifugation in Percoll. *Gamete Res* 1983; 7:49-61.
- Lewis RV, Agustin JS, Kruggel W, Lardy HA. The structure of caltrin, the calcium inhibitor of bovine seminal plasma. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 1985; 82:6490-6491.
- Leyton L, Saling PM. 95 KD sperm proteins bind ZP3 and serve as substrates for tyrosine kinase in response to zona binding. *Cell* 1989b; 57: 1123-1130.
- Leyton L, Saling PM. Evidence that the aggregation of mouse sperm receptors by ZP3 triggers the acrosome reaction. *J Cell Biol* 1989a; 108:2163-2168.
- Lindemann CB, Kanous KS. Regulation of mammalian sperm motility. *Arch Androl* 1989; 23:1-22.
- Lindemann CB, Goltz JS, Kanous KS. Regulation of activatin state and flagellar wave form

in epididymal rat sperm: Evidence for the involvement of both Ca^{2+} and cAMP. *Cell Motil Cytoskeleton* 1987; 8:324-332.

Lindemman CB. A cAMP-induced increase in the motility of demembrated bull sperm models. *Cell* 1978; 13:9-18.

Ling L, Jufen Q, Yong Z. In vitro fertilization of goat ovarian oocytes. *Theriogenology* 1992; 37:247.

Lonergan P, Vergos E, Kinis A, Sharif H, Gallagher M, Gordon I. The effect of recovery method on the type of bovine oocyte obtained for in vitro maturation. *Theriogenology* 1991; 35:231.

Lopata A, Patullo MJ, Chang A, James B. A method for collecting motile spermatozoa from human semen. *Fert Steril* 1976; 27:677-684.

Lopez LC, Bayna EM, Litoff D, Shaper NL, Shaper JH, Shur BD. Receptor function of mouse sperm surface galactosyltransferase during fertilization. *J Cell Biol* 1985; 101, pp:1501-1510.

Lorton SP, First NL. Hyaluronidase does not disperse the cumulus oophorus surrounding bovine ova. *Biol Reprod* 1979; 21:301-308.

Lu KH, Shi DS, Jiang HS, Goulding D, Boland MP, Roche JF. Comparison of the developmental capacity of bovine oocytes from superovulated and no stimulated heifers. *Theriogenology* 1991; 35:234.

Lu K, Gordon I. Effect of heparin on the capacitation of frozen-thawed bovine spermatozoa used in the in vitro fertilization (IVF) of oocytes matured in vitro. 11th Int.Congr.Anim.Reprod.A.I. 1988; 3:339-341.

Lu KH, Boland MP, Crosby TF, Gordon I. In vitro fertilization of cattle oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 1987; 27:251.

Lui CN, Cornett LE, Meizel S. Identification of the bovine follicular protein involved in the in vitro induction of the hamster sperm acrosome reaction. *Biol Reprod* 1977; 17:34-41.

Llanos MN, Meizel S. Phospholipid methylation increases during capacitation of golden hamster sperm in vitro. *Biol Reprod* 1983; 28, 1043-1051.

Llanos M, Vigil P, Salgado AM, Morales P. Inhibition of the acrosome reaction by trypsin inhibitors and prevention of penetration of spermatozoa through the human zona pellucida. *J Reprod Fert* 1993; 97, 173-178.

Llanos MN, Morales PJ, Anabalon MC. Characterization of the progesterone induced hamster sperm acrosome reaction. *Biol Reprod* 1993; 48, suppl. 1, 106(190).

Macek MB, Shur BD. Protein-carbohydrate complementarity in mammalian gamete

recognition. *Gamete Res* 1988; 20:93-109.

Mahadevan MM, Trounson AO, Wood C, Leeton JF. Effect of oocyte quality and sperm characteristics on the number of spermatozoa bound to the zona pellucida of human oocytes inseminated in vitro. *J In Vitro Fert Embryo Transfer* 1987; 4:223-227.

Mahadevan MM, Trounson AO. The influence of seminal characteristics on the success rate of human in vitro fertilization. *Fert Steril* 1984; 42:400-405.

Mahadevan MM, Trounson AO. Removal of the cumulus oophorus from the human oocytes for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1985; 43:263-267.

Mahanes MS, Ochs DL, Eng LA. (1986). Cell calcium of ejaculated rabbit spermatozoa before and following in vitro capacitation. *Biochem Biophys Res Commun* 1986;134:664-670.

Mandal M, Banerjee S, Majumder GC. Stimulation of forward motility of goat caudal epididymal spermatozoa by a serum glycoprotein factor. *Biol Reprod* 1989; 41:983-989.

Mann T, Lutwak-Mann C. *Male Reproductive Function and semen*. Springer-Verlag, New York, 1981.

Mann JR. Full term development of mouse eggs fertilized by a spermatozoon microinjected under the zona pellucida. *Biol Reprod* 1988; 38, 1077-1083.

Marquant-Le Guienne B, Thibault C. Fécondation in vitro d'ovocytes bovins maturés in vivo ou in vitro. En: 25th Coll Soc Fr Et Fertil, 1987; pp.145-150. Masson, Paris.

Marquant-Le Guienne B, Humblot P, Thibier M, Thibault C. Evaluation of bull semen fertility by homologous in vitro fertilization tests. *Reprod Nutr Dev* 1990; 30:259-265.

Martino A, Palomo MJ, Mogas T, Paramio MT. Influence of the collection technique of prepubertal goat oocytes on in vitro maturation and fertilization. *Theriogenology* 1994b; 42:859-873.

Martino A, Mogas T, Palomo MJ, Paramio MT. Meiotic competence of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology* 1994a; 41:969-980.

Mattioli M, Bacci ML, Galeati G, Seren E. Effects of LH and FSH on the maturation of pig oocytes in vitro. *Theriogenology* 1991; 36:95-105.

McBride CE, Fayer-Hosken RA, Younis A, Brackett BG. Comparison of rabbit and bovine salt-stored zonae for sperm penetration. *J Androl* 1988; 9(suppl.):34.

McLaughlin EA, Ford WCL, Hull MGR. Effect of the phosphodiesterase inhibitor pentoxifylline and the calcium ionophore A23187 on the intracellular cAMP content and the acrosome reaction of human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1992; Abstract series 10:49.

McNutt TL, Killian GJ. Influence of bovine follicular and oviduct fluids on sperm capacitation

in vitro. *J Androl* 1991; 12(4): 244-252.

Meizel S, Working PK. Further evidence suggesting the hormonal stimulation of hamster sperm acrosome reactions by catecholamines in vitro. *Biol Reprod* 1980; 22:211-216.

Meizel S, Pillai MC, Díaz-Perez E, Thomas P. Initiation of the human sperm acrosome reaction by components of human follicular fluid and cumulus secretions including steroids. En: *Fertilization in mammals*. Eds: Bavister BD, Cummins J, Roldan ERS, Serono Symposia, Norwell, 1990; pp:205-222.

Meizel S. The importance of hydrolytic enzymes to an exocytotic event, the mammalian sperm acrosome reaction. *Biol Rev* 1984; 59, 125-157.

Meizel S. Molecules that initiate or help stimulate the acrosome reaction by their interaction with the mammalian sperm surface. *Am J Anat* 1985; 174:285-302.

Meizel S, Turner KO. Effects of polyamine biosynthesis inhibitors on the progesterone-initiated increase in intracellular free Ca^{2+} and acrosome reactions in human sperm. *Mol Reprod Dev* 1993; 34:457-465.

Meizel S, Lui CW, Working PK, Mrsny RJ. Taurine and hypotaurine: Their effects on motility, capacitation and the acrosome reaction of hamster sperm in vitro and their presence in sperm and reproductive tract fluids of several mammals. *Dev Growth Diff* 1980; 22:483-494.

Melendrez C, Berger T, Meizel S. Progesterone initiation of the porcine acrosome reaction in vitro. *Biol Reprod* 1993; 48, suppl. 1:107(193).

Mermillod P, Wils C, Massip A, Dessy F. Collection of oocytes and production of blastocyst in vitro from individual, slaughtered cows. *J Reprod Fert* 1992; 96:717-723.

Mermillod P, Saumande J. Developmental competence of oocytes from small follicles of prepubertal slaughtered calves. V Colloque Franco-Tchécoslovaque sur la Reproduction des Animaux Domestiques, Jouy-en-Josas, France, 1992; p.15.

Meyers SA, Liu IKM, Overstreet JW, Drobnis EZ. Capacitation of stallion sperm in vitro assessed by progesterone-induced acrosome reaction. *Biol Reprod* 1993; 48, suppl.1:107(194).

Miller DJ, Winer MA, Ax RL. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. *Biol Reprod* 1990; 42(5-6):899-915.

Miller DJ, Ax RL. Carbohydrates and fertilization in animals. *Molec Reprod Develop* 1990; 26:184-198.

Miller GF, Gliedt DW, Rakes JM, Rorie RW. Addition of penicillamine, hypotaurine and epinephrine (PHE) or bovine oviductal epithelial cells (BOEC) alone or in combination to bovine in vitro fertilization medium increases the subsequent embryo cleavage rate. *Theriogenology* 1994; 41:689-696.

- Miller GF, Gliedt DW, Lester TD, Pierson JM, Rakes JM, Rorie RW. Addition of bovine oviductal epithelial cells (BOEC) and/or penicillamine, hypotaurine and epinephrine (PHE) to bovine in vitro fertilization (IVF) medium increases the subsequent embryo cleavage rate. *Theriogenology* 1992; 37:259.
- Miyamoto H, Chang MC. Development of mouse eggs fertilized in vitro by epididymal spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1972; 30:135-137.
- Miyazaki S, Igusa Y. Fertilization potential in golden hamster eggs consists of recurring hyperpolarizations. *Nature* 1981; 290:702-704.
- Miyazaki S. Repetitive calcium transients in hamster oocytes. *Cell Calcium* 1991; 12:205-216.
- Miyazaki S, Shirakawa H, Nakada K, Honda Y, Yuzaki M, Nakada S, Mikoshiba K. Antibody to the inositol triphosphate receptor blocks trimerosal-enhanced Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release and Ca^{2+} oscillations in hamster eggs. *FEBS* 1992; 309:180-184.
- Mogas T. Producció in vitro d'embrions pre-implantacionals en el cabrum. Tesis Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona.1994.
- Mole JR, Fitzgerald JA. Comparison of ram semen sperm interaction with bovine cervical mucus. *Theriogenology* 1990; 33(5):1031-1043.
- Moller CC, Wassarman PM. Characterization of a proteinase that cleaves zona pellucida glycoprotein ZP2 following activation of mouse eggs. *Dev Biol* 1989; 132:103-112.
- Moohan JM, Lindsay KS. Human sperm selected by discontinuous Percoll density gradient exhibit enhanced motion characteristics. *J Reprod Fert* 1993; Abstract series No. 12: 53.
- Moohan JM, Winston RML, Lindsay KS. Variability of human sperm response to immediate and prolonged exposure to pentoxifylline. *Human Reprod* 1993; 8:1696-1700.
- Moore HDM, Bedford JM. The interaction of mammalian gametes in the female. En: *Mechanism and control of animal fertilization*. Eds Hartmann JF, Academic Press, New York. 1983; pp:453-497.
- Mortimer D, Curtis EF, Miller RG. Specific labeling by peanut agglutinin of the outer acrosomal membrane of the human spermatozoon. *J Reprod Fert* 1987; 81:127-135.
- Mortimer D, Camenzind AR. The role of follicular fluid in inducing the acrosome reaction of human spermatozoa incubated in vitro. *Human Reprod* 1989; 4(2):169-174.
- Mrsny RJ, Meizel S. Potassium ion influx and Na^+,K^+ -ATPase activity are required for the hamster sperm acrosome reaction. *J Cell Biol* 1981; 91:77-82.
- Murphy SJ, Roldan ERS, Yanagimachi R. Effects of extracellular cations and energy substrates on the acrosome reaction of precapacitated guinea pig spermatozoa. *Gamete Res* 1986; 14, 1-10.

Myles DG, Koppel DE, Primakoff P. Sperm surface domains and fertilization. In: Fertilization in Mammals. Eds. Bavister BD, Cummins J, Roldan ERS. Serono Symposia, Norwell. 1990; pp 169-177.

Nass SJ, Miller DJ, Winer MA, Ax RL. Male accessory sex glands produce heparin-binding proteins that bind to cauda epididymal spermatozoa and are testosterone dependent. *Molec Reprod Develop* 1990; 25(3):237-246.

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

Ng FLH, Liu DY, Baker HWG. Comparison of Percoll, mini-Percoll and swim-up methods for sperm preparation from abnormal semen samples. *Human Reprod* 1992; 7(2):261-266.

Nicolson GL, Brodginiski AB, Beatti G, Yanagimachi R. Cell surface changes in the protein of rabbit spermatozoa during epididymal passage. *Gamete Res* 1979; 2:153-162.

Niwa K, Ohgoda O. Synergistic effect of caffeine and heparin on in-vitro fertilization of cattle oocytes matured in culture. *Theriogenology* 1988; 30(4):733-741.

Niwa K, Ohgoda O, Yuhara M. Effects of caffeine in media for pretreatment of frozen-thawed sperm on in vitro penetration of cattle oocytes. *Proc 11th Int Congr Anim Reprod A.I., Dublin, 1988; 3:346.*

O'Rand MG. Modification of the sperm membrane during capacitation. *Ann NY Acad Sci* 1982; 383:392-404.

O'Rand MG, Welch JE, Fisher SJ. Sperm membrane and zona pellucida interactions during fertilization. En: *Molecular and Cellular Aspects of Reproduction, 1986; pp:131-144.* Dhindsa, D.S.; Bahl, P., Plenum Press, New York.

O'Rand MG, Fisher SJ. Localitation of zona pellucida binding sites on rabbit spermatozoa and induction of the acrosome reaction by solubilized zonae. *Dev Biol* 1987; 119:551-559.

O'Rand MG. Sperm-egg recognition and barriers to interspecies fertilization. *Gamete Res* 1988; 315-328.

Ohgoda O, Niwa K, Yuhara M, Takahashi S, Kanoya K. Variations in penetration rates in vitro of bovine follicular oocytes do not reflect conception rates after artificial insemination using frozen semen from different bulls. *Theriogenology* 1987; 29:1375-1381.

Olds-Clarke P. Variation in the quality of sperm motility and its relationship to capacitation. En: *Fertilization in mammals.* Eds: Bavister BD, Cummins J, Roldan ERS, Serono Symposia, Norwell, 1990; pp:91-99.

Oliphant G, Brackett BG. Capacitation of mouse spermatozoa in media with elevated ionic strength and reversible decapacitation with epididymal extract. *Fert Steril* 1973; 24:948-955.

Oliphant G, Reynolds AB, Thomas TS. Sperm surface components involved in the control of the acrosome reaction. *Am J Anat* 1985; 174:269-283.

Oliphant G, Brackett BG. Immunological assessment of surface changes of rabbit sperm undergoing capacitation. *Biol Reprod* 1973; 9: 404-414.

Orgebin-Crist MC. Studies of the function of the epididymis. *Biol Reprod* 1969;suppl 1:155-175.

Osman RA, Andria ML, Jones AD, Meizel S. Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 160:828-833.

Overstreet JW, Cooper GW. Reduced sperm motility in the isthmus of the rabbit oviduct. *Nature* 1975; 258:718-719.

Overstreet JW, Cooper GW, Katz DF. Sperm transport in the reproductive tract of the female rabbit. II. The sustained phase of the transport. *Biol Reprod* 1978; 19:115-132.

Overstreet JW. Transport of gametes in the reproductive tract of the female mammal. En: *Mechanism and control of animal fertilization*. Eds Hartmann JF, Academic Press, New York, 1983; pp:499-543.

Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Induction of acrosome reaction in human spermatozoa used for subzonal insemination. *Human Reprod* 1992; 7(2):248-254.

Palma GA, Clement-Sengewald A, Krefft H. In vitro production of cattle embryos from calf oocytes. *Theriogenology* 1993; 39:278.

Palmer E, Bézard J, Magistrini M, Duchamp G. In vitro fertilization in the horse. A retrospective study. *J Reprod Fert* 1991; Suppl 44:375-384.

Paquignon M, Dacheux JL, Jeulin C, Fauquenot A. Laser light scattering study of spermatozoa motility of domestic animals. En: *The Sperm Cell*. Eds J André. The Netherland, Martinus Nijhoff, 1983:332-335.

Pariset CC, Feinberg J, Dacheux JL, Weinman S. Changes in calmodulin level and cAMP-dependent protein kinase activity during epididymal maturation of ram spermatozoa. *J Reprod Fert* 1985; 75:105-112.

Parks JE, Hammerstedt RH. Developmental changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. *Biol Reprod* 1985; 32:653-668.

Parks JE, Ehrenwald E. Cholesterol efflux from mammalian sperm and its potential role in capacitation. In: *Fertilization in Mammals*. Eds. Bavister BD, Cummins J, Roldan ERS. Serono Symposia, Norwell, 1990:155-167.

Parrish JJ, Suskó-Parrish JL, Critser ES, Leibfried-Rutledge ML, Barnes F, Eyestone WH, First NL. Bovine in vivo fertilization. *11th Tech AI and Reprod* 1988:120.

Parrish JJ, Susko-Parrish JL, First NL. Role of heparin in bovine sperm capacitation. *Biol Reprod* 1985c; 32(1):211.

Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH, First NL. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 1986; 25:591-600.

Parrish JJ, Parrish JL, First NL. Effect of swim-up separation and heparin pretreatment of frozen-thawed spermatozoa on in vitro fertilization of bovine oocytes. *Biol Reprod* 1984; 32(1):112.

Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Handrow RR, Sims MM, First NL. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. *Biol Reprod* 1989; 40:1020-1025.

Parrish JJ, Susko-Parrish JL, First NL. Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm in vitro. *Theriogenology* 1985a; 24(5):537-549.

Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Winer MA, First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod* 1988; 38:1171-1180.

Parrish JJ, Susko-Parrish JL, First NL. In vitro fertilization of bovine oocytes using heparin treated and swimup separated frozen thawed bovine semen is repeatable and results in high frequencies of fertilization. *Theriogenology* 1985b; 23:216.

Parrish JJ, Susko-Parrish JL, First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin: inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. *Biol Reprod* 1989; 41:683-699.

Pavlok A, Torner H, Motlík J, Fulka J, Kauffold P, Duschinski U. Fertilization of bovine oocytes in vitro: effect of different sources of gametes on fertilization rates and frequency of fertilization anomalies. *Anim Reprod Sci* 1988; 16:207-213.

Perreault SD, Zirkin BR, Rogers BJ. Effect of trypsin inhibitors on acrosome reaction of guinea pig spermatozoa. *Biol Reprod* 1982; 26:343-351.

Perreault SD. Regulation of sperm nuclear reactivation during fertilization. En: *Fertilization in mammals*. Eds: Bavister BD, Cummins J, Roldan ERS, Serono Symposia, Norwell, 1990:285-296.

Peterson RN, Hunt WP, Henry LH. Interaction of boar spermatozoa with porcine oocytes: Increase in proteins with affinity for the zona pellucida during epididymal transit. *Gamete Res* 1986; 14:57-64.

Phillips DM, Shalgi RM. Sperm penetration into rat ova fertilized in vitro. *J Exp Zool* 1982; 221:373-378.

Phillips DM. Electron microscopy of mammalian fertilization. En: *Elements of Mammalian Fertilization*. (Eds.) Wassarman PM. Vol.1, Boca Raton, Florida, CRC Press, 1991:249-267.

Pholpramool C, Chaturapanich G. Effect of sodium and potassium concentrations and pH on the maintenance of motility of rabbit and rat epididymal spermatozoa. *J Reprod Fert* 1979; 57:245-251.

Pillai MC, Meizel S. Trypsin inhibitors prevent the progesterone-initiated increase in intracellular calcium required for the human sperm acrosome reaction. *J Exp Zool* 1991; 258: 384-393.

Pollard JW, Plante C, King WA, Hansen PJ, Betteridge KJ, Suarez SS. Fertilizing capacity of bovine sperm may be maintained by binding to oviductal epithelial cells. *Biol Reprod* 1991; 44:102-107.

Potts CD, Ford WCL, Hull MGR. The effect of calmidazolium on the progesterone-induced rise in intracellular calcium of human spermatozoa. *J Reprod Fert* 1992; Abstract series No. 9:46.

Presti FT. The role of cholesterol in regulating membrane fluidity in *Biology In: Membrane Fluidity in Biology, Vol.4: Cellular Aspects*, edited Aloia RC, Boggs JM, Academic Press, Orlando, 1985: 97-146.

Pursel VG, Johnson LA, Rampacek GB. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. *J Anim Sci* 1972; 34:278-283.

Purvis K, Egdetveit I. Factors affecting sperm yield during swim-up. *J Assisted Reprod Genetics* 1993; 10:145-150.

Rana N, Jeyendran RS, Holmgren WJ, Rotman C, Zaneveld JD. Glass wool-filtered spermatozoa and their oocyte penetrating capacity. *J In Vitro Fert Embryo Transfer* 1989; 6:280-284.

Rao VN, Bhargava PM. Isolation, characterization and possible mode of action antiseminal plasmin, a new protein that inhibits the antimicrobial activity of seminal plasmin. *Biochem J* 1985; 277:609-619.

Ravnik SE, Zarutskie PW, Muller CH. Lipid transfer activity in human follicular fluid: relation to human sperm capacitation. *J Androl* 1990; 11: 216-226.

Raychoudhury SS, Suarez SS. Porcine sperm binding to oviductal explants in culture. *Theriogenology* 1991; 36 (6): 1059-1071.

Rehman N, Collins AR, Wright Jr RW. Effect of sperm exposure time on in vitro fertilization and embryo development of bovine oocytes. *Theriogenology* 1993; 39:294.

Rogers BJ, Ueno M, Yanagimachi R. Fertilization by guinea pig spermatozoa requires potassium ions. *Biol Reprod* 1981; 25:639-648.

Roldan ERS, Harrison RAP. Molecular mechanisms leading to exocytosis during the sperm acrosome reaction. *En: Fertilization in mammals*. Eds: Bavister BD, Cummins J, Roldan ERS,

Serono Symposia, Norwell, 1990:179-196.

Roldan ERS, Fleming AD. Is a Ca^{2+} -ATPase involved in Ca^{2+} regulation during capacitation and the acrosome reaction of guinea pig spermatozoa. *J Reprod Fert* 1989; 85:297-308.

Roldan ERS, Shibata S, Yanagimachi R. Effect of Ca^{2+} channel antagonists on the acrosome reaction of guinea pig and golden hamster spermatozoa. *Gamete Res* 1986; 13:281-292.

Roldan ERS, Harrison RAP. Absence of active protein kinase C in ram spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 155:901-906.

Roldan ERS. Biology of sperm membranes: implications for capacitation and the acrosome reaction. *Proc 7^a Jornadas Int Reprod Anim, Murcia, 1994:53-59.*

Rosado A, Velazquez A, Lara-Ricalde R. Cell polarography. II. Effect of neuraminidase and follicular fluid upon the surface characteristics of human spermatozoa. *Fertil Steril* 1973; 24:349-354.

Roudebush WE, Fukuda AI, Minhas BS. Enhanced embryo development of rabbit oocytes fertilized in vitro with platelet activating factor (PAF)-treated spermatozoa. *J Assisted Reprod Genetics* 1993; 10:91-94.

Ruknudin A, Silver IA. Ca^{2+} uptake during capacitation of mouse spermatozoa and the effect of an anion transport inhibitor on Ca^{2+} uptake. *Mol Reprod Dev* 1990; 26:63-68.

Saacke RG, Marshall CE. Observations on the acrosomal cap of fixed and unfixed bovine spermatozoa. *J Reprod Fert* 1968; 16:511-514.

Saeki K, Hoshi M, Leibfried-Rutledge ML, First NL. In vitro fertilization and development of bovine oocytes matured with commercially available follicle stimulating hormone. *Theriogenology* 1990; 34:1035-1039.

Saeki K, Hoshi M, Leibfried-Rutledge ML, First NL. In vitro fertilization and development of bovine oocytes matured in serum-free medium. *Biol Reprod* 1991a; 44:256-260.

Saeki K, Kato H, Hosoi Y, Miyake M, Utsumi K, Iritani A. Early morphological events of in vitro fertilized bovine oocytes with frozen-thawed oocytes. *Theriogenology* 1991b; 35:1051-1058.

Saeki K, Nagao Y, Hoshi M, Nagai M. Effects of heparin, sperm concentration and bull variation on in vitro fertilization of bovine oocytes in a protein-free medium. *Theriogenology* 1995; 43:751-759.

Saling PM. Development of the ability to bind zonae pellucidae during epididymal maturation. *Biol Reprod* 1982; 26:429-436.

Saling PM, Storey BT. Mouse gamete interactions during fertilization in vitro. Chlortetracycline as a fluorescent probe for the mouse sperm acrosome reaction. *J Cell Biol*

1979; 83:544-555.

Saling PM, Irons G, Waibel R. Mouse sperm antigens that participate in fertilization. I. Inhibition of sperm fusion with the egg plasma membrane using monoclonal antibodies. *Biol Reprod* 1985; 33:515-526.

Saling PM. (1981) Involvement of trypsin-like activity in binding of mouse spermatozoa to zonae pellucidae. *Proc Nat Acad Sci USA* 1981; 78:6231-6235.

Saling, P.M., Lakoski, K.A. (1985). Mouse sperm antigens that participate in fertilization. II. Inhibition of sperm penetration through the zona pellucida using monoclonal antibodies. *Biol Reprod* 33:527-536.

Saling PM, Bunch DO, Le Guen P, Leyton L. ZP3-induced acrosomal exocytosis: a new model for triggering. En: *Fertilization in mammals*. Eds: Bavister BD, Cummins J, Roldan ERS, Serono Symposia, Norwell, 1990:239-252.

Saling PM. Mammalian sperm interaction with extracellular matrices of the egg. En: Milligan SR. (Ed.) *Oxford Reviews of Reproductive Biology* 1989; 11:339-88. Oxford University Press.

Saling PM. How the eggs regulates sperm function during gamete interaction: facts and fantasies. *Biol Reprod* 1991; 44:246-251.

Schellander K, Brackett BG, Keefer CL, Fayerer-Hosken RA. Testing capacitation of bull sperm with zona-free hamster ova. *Anim Reprod Sci* 1989; 18:95-104.

Schuetz AW, Dubin NH. Progesterone and prostaglandin secretion by ovulated rat cumulus cell-oocyte complexes. *Endocrinology* 1981; 108:457-463.

Seaton AD, Catt JW, Rhodes SL, McDonald MF, Welch RAS. The use of unfrozen semen for in vitro fertilization of in vitro matured bovine oocytes. *Proc New Zealand Society Anim Prod* 1991; 51:67-71.

Seidel GE Jr, Leipold SD, Shawki H. Preparation of bovine sperm for in vitro fertilization by swim-up or centrifugation through Percoll or BSA. *Theriogenology* 1995; 43(1):319.

Setchell BP. Male reproductive organs and semen. En: *Reproduction in domestic animals*. 4th edition. Eds: Cupps PT. Academic Press, Inc, 1991:221-249.

Shalgi R, Phillips DM. Mechanics of in vitro fertilization in the hamster. *Biol Reprod* 1980; 23:433-448.

Shalgi R, Phillips DM, Jones R. Status of the rat acrosome during sperm-zona pellucida interactions. *Gamete Res* 1989; 22:1-13.

Shams-Borhan G, Harrison RAP. Production, characterization, and use of ionophore-induced, calcium-dependent acrosome reaction in ram spermatozoa. *Gamete Res* 1981; 4:407-432.

Shamsuddin M, Rodriguez-Martinez H. Use of hyaluronic acid-selected spermatozoa for in vitro fertilization in the bovine. *J Reprod Fert* 1993; Abstract series No 11:66.

Shi DS. Studies related to factors affecting the yield of bovine embryos produced by in vitro techniques. PhD Thesis, National University of Ireland, Dublin, 1991.

Shivaji S, Bhargava PM. Antifertility factors of mammalian seminal fluid. *Bio Assays* 1987; 7 (1):13-17

Shorgan B. Fertilization of goat and ovine ova in vitro by ejaculated spermatozoa after treatment with ionophore A23187. *Bull Nippon Vet Zootech College*, 1984; 33:219-221.

Singh JP, Babcock DF, Lardy HA. Motility activation, respiratory stimulation, and alteration of Ca^{2+} transport in bovine sperm treated with amine local anesthetic and calcium transport antagonists. *Arch Biochem Biophys* 1983; 221:291-303.

Sinowatz FY, Gabius HJ, Amselgruber W. Surface sugar binding components of bovine spermatozoa as evidenced by fluorescent neoglycoproteins. *Histochemistry* 1988; 88:395-399.

Sirard MA, Lambert RD. Birth of calves after in vitro fertilization using laparoscopy and rabbit oviduct incubation of zygotes. *Veterinary Record* 1986; 119:167-169.

Sirard MA, Parrish JJ, Ware CB, Leidfried-Rutledge ML, DL, First NL. The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. *Biol Reprod* 1988; 39:546-552.

Slaweta R, Laskowska T. The effect of glutathione on the motility and fertility of frozen bull sperm. *Anim Reprod Sci* 1987; 13:249-253.

Smith TT, Yanagimachi R. The viability of hamster spermatozoa stored in the isthmus of the oviduct: the importance of sperm-epithelium contact for survival. *Biol Reprod* 1990; 42:450-457.

Smith TT, Koyanagi F, Yanagimachi R. Distribution and number of spermatozoa in the oviduct of the golden hamster after natural mating and artificial insemination. *Biol Reprod* 1987; 37:225-234.

Smith TT and Yanagimachi R. Capacitation status of hamster spermatozoa in the oviduct at various times after mating. *J Reprod Fert* 1989; 86:255-261.

Smith TT, Yanagimachi R. Attachment and release of spermatozoa from the caudal isthmus of the hamster oviduct. *J Reprod Fert* 1991; 567-573.

Song HB, Iritani A. In vitro fertilization of goat follicular oocytes with epididymal spermatozoa capacitated in a chemically defined medium. *Proc 3rd AAP Anim Sci Congr*, Seoul, Korea, 1985.

Song HB, Iritani A. In vitro fertilization of goat follicular oocytes with epididymal spermatozoa. *Korean J Anim* 1988; 30:636-642.

Song HB, Iritani A. Studies on in vitro maturation of follicular oocytes in the immature goats. *Korean J Anim* 1987; 29:303-309.

Staigmiller RB. In vitro methods for production of viable oocytes. *J Anim Sci* 1988; 66(2):54-64.

Staigmiller RB, Moor RM. Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of ovine oocytes matured outside the follicle. *Gamete Res* 1984; 9:221-229.

Steeno O, Adimoelja A, Steeno J. Separation of X and Y bearing human spermatozoa with the Sephadex gel filtration method. *Andrologia* 1985; 7:95-97.

Stein DM, Fraser LR, Monks NJ. Adenosine and Gpp(NH)p modulate mouse sperm adenylate cyclase. *Gamete Res* 1986; 13:151-158.

Stein DM, Fraser LR. Cyclic nucleotide metabolism in mouse epididymal spermatozoa during capacitation in vitro. *Gamete Res* 1984; 10:283-299.

Stephoe PC, Edwards RG. Birth after reimplantation of a human embryo. *Lancet* 1978; 2:366.

Stice SL, Robl JM. Activation of mammalian oocytes by a factor obtained from rabbit sperm. *Mol Reprod Dev* 1990; 25:272-280.

Stojanoff A, Bourne H, Andrews AG, Hyne RV. ¿título?. *Gamete Res* 1988; 21:297-311.

Stubings RB, Liptrap RM, DT, Basrur PK. Estradiol and progesterone concentrations in fetal bovine serum and their implication in maturation and fertilization in vitro. *Theriogenology* 1989; 31:260.

Stubings RB, Liptrap RM, Betteridge KJ, Walton JS, Armstrong DT, Basrur PK. Requirements for bovine oocyte maturation in vitro. *Reprod Dom Anim* 1990; 25:158-166.

Stubbings RB, Wosik CP. Glass wool versus swim up separation of bovine spermatozoa for in vitro fertilization. *Theriogenology* 1991; 35(1):276.

Suarez SS, Katz DF, Overstreet JW. Movement characteristics and acrosomal status of rabbit spermatozoa recovered at the site and time of fertilization. *Biol Reprod* 1983; 29:1277-1287.

Suarez SS, Katz DF, Meizel S. Changes in motility that accompany the acrosome reaction in hyperactivated hamster spermatozoa. *Gamete Res* 1984; 10:253-265.

Suarez SS, Vincenti L, Ceglia M. Hyperactivated motility induced in mouse sperm by calcium ionophore A23187 is reversible. *J Exp Zool* 1987; 244:331-336.

Suarez SS, Katz DF, Owen DH, Andrew JB, Powell RL. Evidence for the function of hyperactivated motility in sperm. *Biol Reprod* 1991b; 44:375-381.

Suarez S, Redfern K, Raynor P, Martin F, Phillips M. Attachment of boar sperm to mucosal

explants of oviduct in vitro: Possible role in formation of a sperm reservoir. *Biol Reprod* 1991a; 44, 998-1004.

Suarez SS, Wolf DP, Meizel S. Induction of the acrosome reaction in human spermatozoa by a fraction of human follicular fluid. *Gamete Res* 1986; 14:107-121.

Suarez SS. Sperm transport and motility in the mouse oviduct: observation in situ. *Biol Reprod* 1987; 36:203-210.

Suarez SS. Hamster sperm motility transformations during development of hyperactivation in vitro epididymal maturation. *Gamete Res* 1988; 19:51-65.

Suarez SS. Control of sperm transport in the fallopian tubes. *J Reprod Fert* 19??;

Suarez SS, Dai X, DeMott RP, Redfern K, Miranda MA. Movement characteristics of boar sperm obtained from the oviduct or hyperactivated in vitro. *J Androl* 1992; 13:75-80.

Suarez SS, Varosi SM, Dai X. Intracellular calcium increases with hyperactivation in intact moving hamster sperm and oscillates with the flagellar beat cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:4660-4664.

Sueldo C, Subias E, Oehninger S. Progesterone enhancement of human sperm fertilizing capacity. *Proc Fourteenth World Congress Fertil Steril* 1992; Caracas, 119(Abs.311).

Susko-Parrish JL, Wheeler MB, Ax RL, First NL, Parrish JJ. The effect of penicillamine, hypotaurine, epinephrine and sodium metabisulfite on bovine in vitro fertilization. *Theriogenology* 1990; 33(1):333.

Suzuki F. Morphological aspects of sperm maturation: modification of the sperm plasma membrane during epididymal transport. En: *Fertilization in mammals*. Eds. Bavister BD, Cummins J, Roldan ERS. Sero Symposia, Norwell, 1990:65-75.

Suzuki F. Changes in intramembranous particle distribution in epididymal spermatozoa on the boar. *Anat Rec* 1981; 199:361-376.

Swann K. A cytosolic sperm factor stimulates repetitive calcium increases and mimics fertilization in hamster eggs. *Development* 1990; 110:1295-1302.

Sweeney A, Tomkins PT. Optimisation of the electrically-induced sperm acrosome reaction: advantages of Baekonization. *Irish Chemical News* 1993b; 8:24 (Abs.).

Sweeney A, Tomkins PT. Accessibility of acrosomal markers in bovine spermatozoa following Baekonization. *Irish Chemical News* 1993a; 8:23 (Abs.).

Szollosi D, Hunter RHF. The nature and occurrence of the acrosome reaction in spermatozoa of the domestic pig, *Sus scrofa*. *J Anat* 1978; 127:33-41.

Takano H, Yanagimachi R, Urch U. Evidence that acrosine activity is important for the

development of fusibility of mammalian spermatozoa with oolema: inhibitor studies using the golden hamster. *Zygotes* 1993; 1:79-91.

Takagi Y, Mori K, Tomizawa M, Takahashi T, Sugawara S, Masaki J. Development of bovine oocytes matured, fertilized and cultured in a serum-free chemically defined medium. *Theriogenology* 1991; 35:1197-1207.

Talbot P, DiCarlantonio G, Zao P, Penkala J, Haimo LT. Motile cells lacking hyaluronidase can penetrate the hamster oocyte cumulus complex. *Dev Biol* 1985; 108:387-398.

Talbot P. Hyaluronidase dissolves a component of the hamster zona pellucida. *J Exp Zool* 1984; 229:309-316.

Talbot P, Chacon R. A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. *J Exp Zool* 1981; 215:201-208.

Talbot P, Franklin LE. Morphology and kinetics of the hamster sperm acrosome reaction. *J Exp Zool* 1976; 198:163-175.

Tanphaichitr N, Lee G, Randall M, Seibel M, Fitzgerald L, Taymor M. An increase in in vitro fertilization ability of low-density human sperm capacitated by multiple-tube swim-up. *Fert Steril* 1987; 48:821-827.

Tash JS, Means AR. Regulation of protein phosphorylation and motility of sperm by cyclic adenosine monophosphate and calcium. *Biol Reprod* 1982; 26:745-763.

Tash JS, Means AR. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, calcium and protein phosphorylation in flagellar motility. *Biol Reprod* 1983; 28:75-104.

Tesarik J, Flechon JE. Distribution of sterols and anionic lipids in human sperm plasma membrane: effects of in vitro capacitation. *J Ultrastruct Mol Struct Res* 1986; 97:227-237.

Tesarik J, Drahorad J, Peknicova J. Subcellular immunochemical localization of acrosin in human spermatozoa during the acrosome reaction and zona pellucida penetration. *Fert Steril* 1988; 50:133-141.

Tesarik J, Mendoza C, Moos J, Fénichel P, Fehlmann M. Progesterone action through aggregation of a receptor on the sperm plasma membrane. *FEBS*, 1992b; 308(2):116-120.

Tesarik J. Comparison of acrosome reaction-inducing activities of human cumulus oophorus, follicular fluid and ionophore A23187 in human sperm populations of proven fertility ability in vitro. *J Reprod Fertil* 1985; 74:383-388.

Tesarik J, Mendoza C, Moos J, Carreras A. Selective expression of a progesterone receptor of the human sperm surface. *Fertil Steril* 1992a; 58:784-792.

Tesarik J, Mendoza C. Insights into the function of a sperm-surface progesterone receptor: evidence of ligand-induced receptor aggregation and the implication of proteolysis. *Exp Cell*

Res 1993; 205, 111-117.

Tesarik J, Carreras A, Mendoza C. Differential sensitivity of progesterone- and zona pellucida-induced acrosome reactions to pertussis toxin. *Mol Reprod Dev* 1993; 34:183-189.

Tesarik J, Drahorad J, Testar J, Mendoza C. Acrosin activation follows its surface exposure and precedes membrane fusion in human sperm acrosome reaction. *Development* 1990; 110, 391-400.

Tesarik J. Appropriate timing of the acrosome reaction is a major requirement for the fertilizing spermatozoon. *Human Reprod* 1989; 4:957-961.

Tash JS, Means AR. Cyclic adenosin 3',5' monophosphate, calcium and protein phosphorylation in flagella motility. *Biol Reprod* 1983; 28:75-104.

Thibault C, Dauzier L, Wintenberger S. Etude cytologique de la fecondation in vitro de l'oeuf del a lapine. *C R Soc Biol, Paris*, 1954; 148:789-790.

Thibault C, Gérard M. Cytoplasmatic and nuclear maturation of rabbit oocytes in vitro. *Annl Biol Anim Biochim Biophys* 1973, 13:145-159.

Thomas P, Meizel S. An influx of extracellular calcium is required for initiation of the human sperm acrosome reaction induced by human follicular fluid. *Gamete Res* 1988; 20:397-411.

Thomas P, Meizel S. Phosphatidylinositol 4, 5-bis-phosphate hydrolysis in human sperm stimulated with follicular fluid or progesterone is dependent of calcium influx. *Biochem J* 1989; 264:539-546.

Tombes RM, Simerly C, Borisy GG, Schatten G. Meiosis, egg activation, and nuclear envelope breakdown are differentially reliant on Ca^{2+} , whereas germinal vesicle breakdown is Ca^{2+} independent in the mouse oocyte. *J Cell Biol* 1992; 117:799-811.

Tomkins PT, Houghton JA. The rapid induction of the acrosome reaction of human spermatozoa by electropermeabilization. *Fertil Steril* 1988; 50:329-336.

Töpfer-Petersen E, Friess AE, Schill WB. The acrosome reaction in boar spermatozoa. *Human Reprod* 1988; 3(3):319-326.

Töpfer-Petersen E, Henschen A. Acrosin shows zona and fucose binding, novel properties for a serine proteinase. *FEBS Letters* 1987; 226:38-42.

Toyoda Y, Chang MC. Fertilization of rats eggs in vitro by epididymal spermatozoa and the development of eggs following transfer. *J Reprod Fert* 1974; 36:9-22.

Toyoda Y, Yokohama M, Hosi T. Studies on the fertilization of mouse eggs in vitro. I. In vitro fertilization eggs by fresh epididymal sperm. *Jpn J Anim Reprod* 1971a; 16:147-151.

Toyoda Y, Yokohama M, Hosi T. Studies on the fertilization of mouse eggs in vitro. II.

Effects of in vitro pre-incubation of spermatozoa on time of sperm penetration of mouse eggs in vitro. *Jpn J Anim Reprod* 1971b; 16:152-157.

Trounson A. The production of ruminant embryos in vitro. *Anim Reprod Sci* 1992; 28:125-137.

Uguz C, Susko-Parrish JL, Parrish JJ. Cyclic-adenosine monophosphate (cAMP) is elevated during capacitation of bovine sperm by heparin or oviduct fluid. *Theriogenology* 1992; 37(1):311.

Urch UA, Hedrick JL. Acrosin derived peptides bind the zona pellucida. *J Cell Biol* 1985; 101:378.

Utsumi K, Katoh H, Iritani A. Developmental ability of bovine follicular oocytes matured in culture and fertilized in vitro. *Theriogenology* 1988; 29:320.

Vaidya RA, Glass RW, Dandekar P, Johnson K. Decrease in electrophoretic mobility of rabbit spermatozoa following intra-uterine incubation. *J Reprod Fert* 1971; 24:299-301.

Van der Zwalmen P, Bertin-Segal B, Geerts L, Debauche C, Schoysman R. Sperm morphology and IVF pregnancy rates: comparison between Percoll gradient centrifugation and swim-up procedures. *Human Reprod* 1991; 6:581-588.

Varner DD, Ward CR, Storey BT, Kenney RM. Induction and characterization of acrosome reaction in equine sperm. *Am J Vet Res* 1987; 48:1383-1389.

Vázquez JM, Martínez E, Roca J, Ruiz S, Carrizosa JA. Identificación del estado acrosomal y viabilidad de los espermatozoides de verraco por una técnica de triple tinción (T.S.T). 4ª Jornadas Internacionales de Reproducción Animal e Inseminación Artificial. León. 1989:35-38.

Visconti P, Tezon JG. Phorbol esters stimulate cyclic adenosine 3'-5'-monophosphate accumulation in hamster spermatozoa during in vitro capacitation. *Biol Reprod* 1989; 40:223-231.

Voglmayr JK. Metabolic changes in spermatozoa during epididymal transit. En: *Handbook of Physiology, Male Reproductive System, sect 7: Endocrinology, vol.5*. Eds. DW Hamilton & RO Greep. American Physiological Society, Washington, D.C., 1975:437-451.

Wassarman PM. Profile of a mammalian sperm receptor. *Development* 1990; 108:1-17.

Wassarman PM. The biology and chemistry of fertilization. *Science* 1987; 235:553-560.

Wassarman PM. Regulation of mammalian fertilization by gamete adhesion molecules. In: *Spermatogenesis-Fertilization-Contraception. Molecular, Cellular and Endocrine Events in Male Reproduction*. Eds. Nieschlag U-F, Habenicht. Springer-Verlag. 1992:345-366.

Wassarman PM. Zona pellucida glycoproteins. *Annu Rev Biochem* 1988; 57:415-442.

Wassarman P, Bleil J, Fimiani C, Florman H, Greve J, Kinloch R, Moller C, Mortillo S, Roller R, Salzmann G, Vazquez M. The mouse egg receptor for sperm: a multifunctional zona pellucida glycoprotein. En: *The mammalian egg coat*. Eds. Dietl J. Springer-Verlag, 1989..

Watson PF, Plummer JM. Relationship between calcium binding sites and membrane fusion during the acrosome reaction induced by ionophore in ram spermatozoa. *J Exp Zool* 1986; 238:113-118.

Wells ME, Awa OA. New Technique for assessing acrosomal characteristics of spermatozoa. *J Dairy Sci* 1970; 53(2):227-232.

Westrick JC, Boatman DE, Bavister BD. Characteristics of acrosome reaction-inducing factor from hamster cumulus and follicular fluid. *Biol Reprod* 1985; 32:351.

Wheeler MB, Seidel GE Jr. Time course of in vitro capacitation of frozen and unfrozen bovine spermatozoa. *Theriogenology* 1986; 25:216.

Wheeler MB, Seidel GE Jr. Capacitation of bovine spermatozoa by lysophospholipids and trypsin. *Gamete Res* 1988b; 22:193-204.

Wheeler MB, Seidel GE Jr. Capacitation of bull sperm by lysophospholipids and trypsin. *Theriogenology* 1988a; 29:325.

White IG, Voglmayr JK. ATP-induced reactivation of ram testicular, caudal epididymal, and ejaculated spermatozoa extracts with Triton X-100. *Biol Reprod* 1986; 34:183-193.

White IG, Belanger L, Hough S, Ellington J, Foote RH. Biochemical changes in bull spermatozoa during capacitation in vitro. *Theriogenology* 1992; 37:571-578.

White LM, Beal WE, Barne JH, Saacke RG, Marshall CE. Characteristics of bovine spermatozoa after migration through bovine serum albumin gradient. *J Anim Sci* 1984; 59:454-459.

White DR, Aitken RJ. Relationship between calcium, cyclic AMP, ATP, and intracellular pH and the capacity of hamster spermatozoa to express hyperactivated motility. *Gamete Res* 1989; 22:163-177.

Whitfield CH, Parkinson TJ. Relationship between fertility of bovine semen and in vitro induction of acrosome reactions by heparin. *Theriogenology* 1992; 38:11-20.

Whittingham DG. Fertilization of mouse eggs in vitro. *Nature* 1968(Lond.)220:592-593.

Winstrom CA, Meizel S. Evidence that the progesterone-initiated human sperm acrosome reaction involves a putative GABA receptor/Cl⁻ channel complex and Cl⁻ influx. *Biol Reprod* 1992; 46(1) :64.

Wolf DE, Voglmayr JK. Diffusion and regionalization in membranes of maturing ram spermatozoa. *J Cell Biol* 1984; 98:1678-1684.

- Wolf DE, Hagopian SS, Isojima S. Changes in sperm plasma membrane lipid diffusibility after hyperactivation during in vitro capacitation in the mouse. *J Cell Biol* 1986; 102:1372-1377.
- Yanagimachi R, Usui N. Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. *Exp Cell Res* 1974; 89:161-174.
- Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In: *The Physiology of Reproduction*, Eds E Knobil & JD Neill. Raven Press, New York, 1988(1):135-185.
- Yanagimachi R. Requirement of extracellular calcium ions for various stages of fertilization and fertilization-related phenomena in the hamster. *Gamete Res* 1982; 5:323-344.
- Yanagimachi R, Noda YD. Electron microscope studies of sperm incorporation into the hamster egg. *Am J Anat* 1970; 128:429-462.
- Yanagimachi R, Noda YD, Fujimoto M, Nicolson GL. The distribution of negative surface charge of mammalian spermatozoa. *Am J Anat* 1972; 135:497-520.
- Yanagimachi R, Mahi CA. The sperm acrosome reaction and fertilization in the guinea-pig: a study in vivo. *J Reprod Fert* 1976; 46:49-54.
- Yanagimachi R, Cummins JM. Optical changes in the acrosomal caps of golden hamster spermatozoa prior to the acrosome reaction. *Proc Annu Conf Soc Study Reprod, Aberdeen, 1985:abstract 20.*
- Yanagimachi R, Bhattacharyya A. Acrosome-reacted guinea-pig spermatozoa become fusion competent in the presence of extra cellular potassium ions. *J Exp Zool* 1988; 248:354-360.
- Yanagimachi R. Sperm capacitation and gamete interaction. *J Reprod Fert* 1989; Suppl 38:27-33.
- Yanagimachi R. Mechanisms of fertilization in mammals. In: *Fertilization and Embryonic Development in Vitro*. Eds. L Mastroianni & JD Biggers. Plenum Press, New York, 1981:81-182.
- Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In: *The Physiology of Reproduction*, Second Edition. Eds E Knobil & JD Neill. Raven Press Ldt, New York, 1994:189-317.
- Yanagimachi R, Chang MC. Fertilization of hamster eggs in vitro. *Nature* 1963; 200:281-282.
- Yang X, Jiang S, Foote RH. Bovine Oocyte development following different oocyte maturation and sperm capacitation procedures. *Molec Reprod Develop* 1993; 34:94-100.
- Younis AI, Brackett BG, Fayrer-Hosken RA. Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Gamete Res* 1989; 23:189-201.
- Younis AI, Zuelke KA, Harper KM, Oliveira MAL, Brackett BG. In vitro fertilization of

goats oocytes. Biol Reprod 1991; 44:1177-1182.

