



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
IZTAPALAPA

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

"ESTUDIO DE LA ASIMETRÍA DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA
DEL ESPERMATOZOIDE DE CONEJO DURANTE LA
CAPACITACION Y LA REACCION ACROSOMAL."

MAESTRIA EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL.



COORDINACION DE SERVICIOS
DOCUMENTALES - BIBLIOTECA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA
DE LA REPRODUCCION ANIMAL**

P R E S E N T A :

ALEJANDRO AVALOS RODRIGUEZ

DIRECTORES DE TESIS:

M. en C. ANA MARIA ROSALES TORRES

DR. ADOLFO ROSADO GARCIA

A S E S O R :

M. en C. REBECA GARCIA MACEDO

JURADO

222272

PRESIDENTE.

M en C. ANA MARÍA ROSALES TORRES.

SECRETARIO.

DR. ADOLFO ROSADO GARCÍA

PRIMER VOCAL.

DRA. ALDA ROCIO ORTIZ MUÑIZ

SEGUNDO VOCAL.

DR. EFRAÍN MERCADO PICHARDO

EL PRESENTE TRABAJO DE TESIS SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MEDICA EN BIOQUÍMICA, DEL HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI DEL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.

CON EL APOYO DE LA BECA CRÉDITO OTORGADA POR EL CONACYT. (REGISTRO 92031).

Y CON EL APOYO DE UNA BECA OTORGADA POR EL IMSS DESDE FEBRERO DE 1997 HASTA LA FECHA.

Y FINANCIAMIENTO POR PARTE DE CONACYT (PROYECTO No. 0699 P – M9506)

AGRADECIMIENTOS.

ESTA TESIS LA DEDICO A MIS PADRES Y HERMANOS.

A LOS RATONES: SRA. ADELA RODRÍGUEZ AVILA Y EL SR. FIDEL AVALOS LEYVA.

A MIS HERMANOS. HÉCTOR, MARÍA DE LOS ANGELES, LUZ MARÍA, JOSÉ ANTONIO, MIGUEL ANGEL Y GERARDO.

COMO UN TESTIMONIO, DE GRATITUD Y ETERNO RECONOCIMIENTO, POR EL APOYO QUE SIEMPRE SE ME HA BRINDADO Y POR QUE GRACÍAS A EL HE LOGRADO TERMINAR ESTA MAESTRÍA.

A MIS SOBRINAS ALEJANDRA ESTELA, MARÍA FERNANDA, MIRIAM VANESSA, MARIANA DE JESUS Y ANGELES MICHEL.

POR QUE ME HAN HECHO RECORDAR QUE LA VIDA ES UN JUEGO.

A MIS CUÑADAS Y CUÑADOS. MARTHA ALICIA, ARACELI, MIGUEL Y BENIGNO.

POR EL APOYO MORAL QUE SIEMPRE ME HAN BRINDADO.

A TODAS AQUELLAS PERSONAS QUE HAN FALLECIDO Y A LAS QUE SIGUEN VIVIENDO INTENTANDO ARRANCARLE DE SUS ENTRAÑAS UN SECRETO A LA NATURALEZA.

M en C ANA MARÍA ROSALES TORRES.

POR LA DIRECCION DE ESTA TESIS Y POR SU GRAN AMISTAD, BONDAD, ENTUSIASMO, DEDICACIÓN Y EMPEÑO QUE LA CARACTERIZAN Y QUE HA SIDO PARA MÍ EL MEJOR EJEMPLO A SEGUIR.

**DR. ADOLFO ROSADO GARCÍA.
PROFESOR DISTINGUIDO DE LA UAM – I.**

POR VERTER INCONDICIONALMENTE SU AMPLIA SABIDURIA CIENTÍFICA EN ESTE TRABAJO DE TESIS, QUE SIN ELLA HUBIERA SIDO DIFÍCIL SU REALIZACIÓN, Y POR QUE SIEMPRE ES GRATO ROBARLE UN POCO DE SU VIDA.

M en C REBECA GARCÍA MACEDO.

POR SU ENTUSIASMO, DEDICACIÓN Y ACERTADO ASESORAMIENTO ENCAMINADOS HACIA LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO DE TESIS.

DR. OMAR HERNÁNDEZ PÉREZ.

JEFE DEL LABORATORIO DE BIOQUÍMICA MOLECULAR.
CMN. S –XXI. IMSS.

POR LAS FACILIDADES PRESTADAS Y POR SUS CRITICAS CONSTRUCTIVAS,
QUE FUERON TRASCENDENTALES PARA LA REALIZACIÓN DE ESTE
TRABAJO DE TESIS.

DR. EFRAÍN MERCADO PICHARDO.

POR SUS OBSERVACIONES REALIZADAS DESDE LA INICIACIÓN HASTA LA
CULMINACIÓN DE ESTE TRABAJO, SIEMPRE CON MIRAS A SU
MEJORAMIENTO.

M en C. DEMETRIO AMBRÍZ.

POR EL APOYO INCONDICIONAL QUE SIEMPRE ME SUPO BRINDAR.

MVZ. SERGIO ROSAS MACEDO.

JEFE DEL BIOTERIO DE CMN. S-XXI.

POR LA DONACION Y MANTENIMIENTO DE CONEJOS UTILIZADOS EN ESTE
TRABAJO.

M en C YVONNE HEUZE

JEFA DEL BIOTERIO DE LA UAM – X.

POR LA DONACIÓN DE CONEJOS CON QUE SE EXPERIMENTO.

DR. VIANNEY ORTIZ NAVARRETE.

POR SU ASESORIA EN EL USO DEL CITÓMETRO DE FLUJO.

DR. JOSÉ MORENO RODRÍGUEZ.
JEFE DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN
MÉDICA EN REUMATOLOGÍA E INMUNOBIOLOGÍA.

POR SU APOYO INCONDICIONAL PARA EL USO DEL CITÓMETRO DE FLUJO.

DRA. ALDA ROCIO ORTIZ.

POR PERMITIRNOS EL USO DEL CITÓMETRO DE FLUJO EN LA UAM – I.

A MIS AMIGAS

XOCHITL ZAMBRANO, ELIZABET MONTAÑO, GLORIA E. MERCADO, CLARA ORTEGA, MARCELA VERGARA, GISELA FUENTES, LOURDES GALLARDO, LETICIA ALFARO, DORA MARÍA VIDAL.

QUIENES HAN HECHO MÁS PLACENTERA MI ESTANCIA EN ESTE PLANETA.

A MIS AMIGOS

OSWALDO ANGEL, CESAR GONZALEZ, DIEGO GUZMAN, JOSÉ MANUEL GALLOSO, JOSÉ ANTONIO VILLALOBOS, MIGUEL ANGEL LEON, ROBERTO DE ARO, AARÓN, ISRAEL, JUAN, ARMANDO, BERNARDO

POR LOS MOMENTOS DIFÍCILES Y DIVERTIDOS QUE HEMOS COMPARTIDO.

ÍNDICE.

| | |
|----------------------------------|----|
| RESUMEN..... | 3 |
| I.- INTRODUCCIÓN..... | 5 |
| II.- JUSTIFICACIÓN..... | 48 |
| III.- OBJETIVOS GENERALES..... | 49 |
| IV.- OBJETIVOS PARTICULARES..... | 49 |
| V.- HIPÓTESIS..... | 49 |
| VI.-METODOLOGÍA..... | 50 |
| VII.- RESULTADOS..... | 58 |
| VIII.- DISCUSIÓN..... | 67 |
| IX- CONCLUSIONES..... | 72 |
| X.- BIBLIOGRAFÍA..... | 73 |

RESUMEN.

La capacitación puede ser definida, como una serie de cambios bioquímicos en la membrana plasmática que preparan al espermatozoide para la reacción acrosomal. (Austin, 1967; Yanagimachi, 1994). Durante la capacitación se produce una remoción o alteración gradual de glicoproteínas periféricas, una redistribución de glicoproteínas integrales, la reducción de colesterol en la membrana, y cambios en la distribución y composición de fosfolípidos (Yanagimachi, 1995). El calcio extracelular es requerido para completar la capacitación, y para realizar la reacción acrosomal, mediante una acción directa sobre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa permitiendo su fusión y la formación de vesículas así como la liberación de las enzimas acrosomales (Chetham y col., 1990). La reacción acrosomal representa un requerimiento indispensable en la fertilización. A la fecha se desconocen con precisión los cambios membranales que ocurren durante la capacitación, así como aquellos que se requieren para la vesiculación en la reacción acrosomal. El propósito del presente trabajo es conocer si existe movimiento de "flip -flop" en la membrana plasmática del espermatozoide durante la capacitación y la reacción acrosomal. Además se pretende conocer si existen diferencias al respecto entre los espermatozoides del eyaculado y los de cola de epidídimo de conejo Nueva Zelanda, y corroborar la importancia del Ca^{2+} en estos procesos.

Los espermatozoides se obtuvieron de eyaculados, utilizando una vagina artificial y de la cola del epidídimo por cirugía. Las muestras obtenidas, se incubaron a 37°C, en atmósfera de carbógeno en medio Brackett con y sin Ca^{2+} y con y sin ionóforo de calcio A23187 (0.01 mM). Los espermatozoides de cada tratamiento, se incubaron con anexina V fluoresceinada con el propósito de detectar en un citómetro de flujo (FAC Sort Becton Dickinson) su unión a fosfatidilserina y con esto detectar cambios en la asimetría de la membrana.

Los resultados cuando los espermatozoides fueron obtenidos de la cola del epidídimo e incubamos en medio Brackett sin suplemento de calcio fueron; tiempo cero de un 18.39 ± 9.48 , a las 2 horas de incubación de 12.38 ± 4.27 ; a las 4 horas de 14.89 ± 6.51 y a las 6 horas de 16.43 ± 8.17 . 6 horas después, la muestra que se incubó 3 horas más en presencia del ionóforo, mostró el 28.12 ± 4.59 de fluorescencia positiva y sin ionóforo el porcentaje de fluorescencia positiva fue de 17.7 ± 8.2 . Los resultados de las muestras

obtenidas de cola de epidídimo e incubadas en presencia de medio Brackett con suplemento de Ca^{2+} , fue en el tiempo cero 24.61 ± 8.57 , a las 2 horas de incubación 23.66 ± 5.39 , a las 4 horas 35.19 ± 14.91 ; a las 6 horas 38.24 ± 13.04 . y en presencia de ionóforo, la fluorescencia positiva fue 70 ± 7.5 .

Para los experimentos con muestras de espermatozoides eyaculados, fueron. Para las muestras incubadas en medio Brackett sin suplemento de Ca^{2+} . Tiempo cero 16.6 ± 7.5 ; 2 horas 23.06 ± 11.4 ; 4 horas 29.6 ± 10.15 ; a las 6 horas 38.8 ± 9.9 ; a las 9 horas 37 ± 11.24 y la muestra con ionóforo fue de 40.02 ± 13.85 . Los espermatozoides de eyaculado incubados en medio Brackett con suplemento de calcio, para el tiempo cero, 23.1 ± 4.49 ; para 2 horas de incubación 40.9 ± 23.9 ; para 4 horas 41.1 ± 17.8 ; para las 6 horas 42.6 ± 19.2 ; para las 9 horas 60.2 ± 8.47 y para la muestra con ionóforo de 75.9 ± 7.8

Los resultados de este trabajo, evidencian que tanto espermatozoides de eyaculado como de cola de epidídimo, incubados en un medio capacitante, llevan a cabo movimientos de "flip-flop", en sus membranas, con lo cual se produce la pérdida de la asimetría membranal, que es detectada en este caso por la presencia en la cara externa de fosfatidilserina. No se detectaron diferencias entre los espermatozoides de epidídimo y los de eyaculado. El incremento en la concentración de Ca^{2+} citosólico inducido por ionóforo A23187, o por incorporación de Ca^{2+} al medio, produjo una distribución al azar de los lípidos de la membrana y por ende, pérdida de la asimetría de los fosfolípidos de la membrana y la posterior formación de las vesículas, necesarias en la reacción acrosomal. En conclusión podemos decir que hay importantes cambios en la distribución de fosfolípidos, en particular de fosfatidilserina que comienzan desde el proceso de capacitación y se van haciendo más evidentes conforme aumenta el tiempo de incubación. Es importante mencionar que la presencia de Ca^{2+} en el medio favorece la respuesta en capacitación y aún mas en la reacción acrosomal. El uso de la anexina V-FICT en la citometría de flujo es un método eficiente y sensible para evaluar los cambios que sufren las membranas del espermatozoide sometido a tratamiento de capacitación y reacción acrosomal.

I.- INTRODUCCIÓN

1.- ESPERMATOGÉNESIS.

La secuencia de eventos citológicos que concluyen con la formación de un espermatozoide maduro originado a partir de células precursoras, se conoce como espermatogénesis. En la mayoría de los mamíferos, estos eventos se llevan a cabo durante toda la vida reproductiva del macho. En algunas especies estacionales como la cabra y oveja la espermatogénesis puede ser moderada por factores ambientales que se traducen en señales hormonales que la estimulan o la inhiben (Hafez, y col., 1989; Knobil y col., 1994).

A la espermatogénesis se puede dividir en tres fases: A) activación de las células de reserva por el proceso de mitosis; B) reducción del número de cromosomas por meiosis. y C) transformación a células más especializadas (Tortora y col., 1993).

Para que la espermatogénesis se desarrolle, se requiere que las células estén en un medio especializado. Este medio idóneo, es proporcionado principalmente por un tipo de células llamadas de Sertoli, dichas células forman parte de la denominada barrera hemato-testicular y se localizan en el interior de los túbulos seminíferos. Las células espermatogénicas cubren sus necesidades al permanecer en contacto con las células de Sertoli y conforme se van desarrollando migran hacia la luz del túbulo seminífero (Tortora y col., 1993; Knobil, Y col., 1994).

Los túbulos seminíferos están cubiertos con células inmaduras que se llaman Espermatogonias (*sperm* = semilla; *gonium* = generación) o células espermatógenas.

Los primeros estudios sobre las espermatogonias fueron realizados por Regaud en 1901 quien definió dos tipos de espermatogonias en la rata, a una le llamo células "dusty" y a las otras células "crusty", en base a los diferentes patrones de su cromatina nuclear. Las células "dusty" muestran un núcleo teñido pálidamente y con cromatina granular, por otro lado las células "crusty" poseen un núcleo con gránulos burdos y con cromatina que se puede teñir intensamente y que se encuentra muy cerca de la membrana nuclear (Knobil y col., 1994).

Allen en 1918, usó diferentes terminologías para llamar a las espermatogonias, el llamó espermatogonia tipo A, a las células "dusty" y espermatogonia tipo B las células "crusty".

En la rata se han encontrado espermatogonias con características nucleares intermedias entre el tipo A y B. Subtipos similares pueden ser identificados en otras especies como ratón, carnero, toro y cobayo (Knobil y col., 1994).

Las espermatogonias contienen un número cromosómico diploide ($2n$) y aún cuando existe heterogenicidad entre ellas se pueden distinguir tres subtipos de células, que se conocen como: tipo A pálidas, tipo A oscuras y tipo B. Cada una presenta características diferentes en su cromatina nuclear que se pueden distinguir con tinciones especiales. Las espermatogonias tipo A pálidas permanecen relativamente indiferenciadas y capacitadas para llevar a cabo una división mitótica intensa. Después de la división algunas células hijas permanecerán indiferenciadas y sirven como reserva de células precursoras para prevenir la disminución de la población celular, dichas células permanecen cerca de la membrana basal. Los dos tipos de espermatogonias tipo A tienen poco contacto con la membrana basamental de los túbulos seminíferos y sus núcleos no muestran vacuolas nucleares, sus nucleólos se encuentran situados en la periferia y están formados de nucleolema y una parte amorfa (Knobil, y col, 1994).

El resto de las células hijas se diferencian en espermatogonias tipo B, estas células van perdiendo contacto con la membrana basal de los túbulos seminíferos, sufren ciertos cambios en su desarrollo y al final forman los espermatoцитos primarios (Tortora y col., 1993).

Las espermatogonias tipo B tienen un mayor contacto con la membrana basamental y contienen agregaciones de cromatina nuclear situada periféricamente. Debido a que sus secciones no son prominentes, estas sólo son visualizadas por microscopia de alta resolución. El nucleólo de estas células se encuentra situado en el centro y está formado de nucleolema y una parte amorfa. Las mitocondrias están dispersas individualmente en el citoplasma, con una aparente desaparición del material mitocondrial que sí se observa en las espermatogonias tipo A aunque este material vuelve a ser visible en los espermatoцитos primarios, también se ha observado escaso material de retículo endoplásmico liso y rugoso, aunque no hay muchas diferencias con el de las espermatogonias A (Knobil y col., 1994).

ESPERMATOCITOS.

Las células en espermatogénesis que se encuentran en el proceso de meiosis son los espermatocitos primarios y secundarios. El término espermatocito fue usado por primera vez por Von La Valette (Clermont, 1960). al designar así a células que previamente habían sido llamadas células de crecimiento por otros investigadores

Los espermatocitos primarios son diploides ($2n$) al igual que las espermatogonias. Se cree que las espermatogonias tipo A oscuras son células de reserva, que se activan sólo en caso de que las células tipo A pálidas disminuyan en forma considerable.

Cada espermatocito primario crece antes de dividirse. Posteriormente se lleva a cabo el evento conocido como meiosis (Hafez y col., 1989).

El proceso de la meiosis consta de dos divisiones nucleares y celulares a las que se llama primera y segunda división meióticas, o simplemente meiosis I y meiosis II. Cada una de dichas divisiones incluyen las siguientes etapas: profase, metafase, anafase y telofase. Durante la primera división meiótica, los miembros de cada par de cromosomas homólogos se separan y distribuyen entre las células formadas. En la segunda división meiótica, las cromátidas que integran cada cromosoma se separan y distribuyen entre las células hijas (Tortora y col., 1993).

En la primera división, el ácido desoxirribonucleico ya se encuentra duplicado, se condensa la cromatina, se forman los 46 cromosomas en el caso de la especie humana (cada uno con sus dos cromátidas) y se mueven hacia el plano ecuatorial del núcleo. Forman una línea por medio de pares homólogos de cromosomas, de tal manera que hay 23 pares duplicados en el centro del núcleo. Este apareamiento de pares homólogos se llama sinapsis. Las cuatro cromátidas de cada par homólogo se asocian una con otra para formar una tétrada. En la tétrada se pueden intercambiar porciones de cromátidas con porciones de otra. Este proceso se llama entrecruzamiento y permite un intercambio entre cromátidas, lo que origina recombinación de genes. De esta manera se producen espermatozoides genéticamente diferentes unos de otros y diferentes también a las células que los produjo, esta es la razón de la gran variación de características entre los humanos y otras especies. Posteriormente, se forma el huso meiótico y los microtúbulos cromosómicos que se producen en los centrómeros de los cromosomas apareados se extienden hacia los polos de la célula. Conforme se separan los pares de cromosomas, un miembro de cada par migra hacia el polo opuesto del núcleo en división. La disposición al

azar de los pares cromosómicos en el huso, es otra razón para que se presente la variación de características entre individuos de la misma especie. Las células que se forman en la primera división nuclear (división de reducción) se llaman espermatocitos secundarios. Cada célula tiene 23 cromosomas, el número haploide. Sin embargo, cada cromosoma del espermatocito secundario está formado de dos cromátidas. Además, los genes de los cromosomas de los espermatocitos secundarios se pueden reacomodar como consecuencia del fenómeno de entrecruzamiento (Tortora y col., 1993).

La segunda división de la meiosis se conoce como división ecuatorial. En esta no hay duplicación del ácido desoxirribonucleico. Los cromosomas (cada uno compuesto de dos cromátidas) están dispuestos en una sola fila alrededor del plano ecuatorial y las cromátidas de cada cromosoma se separan una de otra. Las células que se forman en la división ecuatorial se llaman espermátidas. Cada una contiene 23 cromátidas ó 23 cromosomas haploides. Por lo tanto cada espermatocito primario produce cuatro espermátidas por medio de la meiosis (división de reducción y división ecuatorial). Las espermátidas se encuentran cerca de la luz de los túbulos seminíferos (Tortora y col., 1993).

2.- ESPERMIOGÉNESIS.

La transformación de espermátidas en espermatozoides involucra una compleja secuencia de eventos que constituyen la espermiogénesis. En este proceso no hay división celular, el proceso es un cambio en el cual una célula se convierte en una estructura altamente organizada con capacidad de movimiento. La mayoría de los procesos de los que se compone la espermiogénesis están presentes en todas las especies, pero hay detalles que difieren entre especies. Hay factores genéticos que determinan las características morfológicas de los diferentes espermatozoides. Los cambios principales que ocurren durante la espermiogénesis son: la formación del acrosoma, cambios nucleares, desarrollo del flagelo, reorganización del citoplasma y organelos, y finalmente se da el proceso de espermiación (Tortora y col., 1993).

Las espermátidas son células esféricas de tamaño pequeño, que se encuentran en la parte luminal del epitelio seminífero. Tienen un núcleo redondo situado en el centro de la célula, poseen un complejo de Golgi bien desarrollado y centriolos adyacentes. Las

mitocondrias se encuentran dispersas por la periferia de la membrana plasmática (Knobil y col., 1994).

El acrosoma es una estructura que surge del aparato de Golgi, esto se estableció a principios de siglo por Bowen a partir de los estudios realizados en mamíferos y otras clases de animales. Gatenby y Beams (Knobil y col., 1994), identificaron gránulos proacrosómicos en el complejo de Golgi de espermátocitos primarios, aunque esto no está del todo esclarecido, lo cierto es que estos gránulos son transmitidos a las células hijas y es probable que representen una proteína secretora que está compactada en el complejo de Golgi. Algunos investigadores sugieren que gránulos similares son elaborados en el aparato de Golgi de espermátidas recientemente formadas (Knobil y col., 1994; Tortora y col., 1993).

Durante la espermatogénesis se da la formación de gránulos proacrosómicos dentro del aparato de Golgi, los cuales se fusionan en uno solo que se une a la cubierta nuclear, además se inicia la formación de la cola del espermatozoide en el extremo opuesto al de la adhesión del gránulo acrosómico. El centriolo proximal se acerca al núcleo, en donde se especula que forma una base para la unión entre la cola y la cabeza (Tortora y col., 1993).

Posteriormente el gránulo acrosómico se extiende adherido a la superficie del núcleo de la espermátida, posteriormente se cubre por una delgada membrana de doble pared que se adhiere estrechamente a la envoltura nuclear. Los componentes axonémicos del flagelo la cola en desarrollo, formados por el centriolo distal, se alargan más allá de la periferia del citoplasma celular (Knobil y col., 1994; Tortora y col. 1993).

Después de estos eventos se presentan cambios importantes en el núcleo, acrosoma y flagelo de las espermátidas, que facilitan la rotación de cada espermátida, de tal manera que el acrosoma se dirige hacia la base o pared externa del túbulo seminífero y la cola hacia la luz. Los cambios nucleares comprenden la condensación de la cromatina en gránulos densos y la transformación del núcleo esferoide en alargado y aplanado. El acrosoma unido al núcleo también se condensa y se alarga. Los cambios morfológicos son ligeramente diferentes en cada especie y de este modo dan origen a espermatozoides característicos de cada especie (Knobil y col., 1994).

Los cambios en la morfología nuclear se acompañan del desplazamiento de citoplasma hacia la parte caudal del núcleo, mismo que rodea la porción proximal de la cola en

desarrollo. Dentro de este citoplasma, los microtúbulos se asocian y forman una vaina cilíndrica temporal, misma que se proyecta hacia la parte posterior desde el borde caudal del acrosoma, en donde rodea al axonema. Dentro de la vaina cilíndrica, una estructura citoplásmica especializada, llamada cuerpo cromatoide, se condensa alrededor del axonema y da lugar a una estructura anular llamada anillo (Knobil y col., 1994).

El anillo primero se forma cerca del centriolo proximal y después, durante el desarrollo subsecuente, se traslada a lo largo de la cola. Las mitocondrias previamente distribuidas en todo el citoplasma de la espermatida, empiezan a concentrarse cerca del axonema y forman la vaina que caracteriza a la pieza media de la cola.

Dentro del núcleo los gránulos de cromatina forman un material homogéneo, que llena todo el núcleo del espermatozoide (knobil y col., 1994).

Posteriormente se forman vainas fibrosas y las nueve fibras gruesas que cubren el axonema, Las fibras gruesas parecen asociarse en forma individual con los nueve pares de microtúbulos del axonema y se continúan con las columnas en el cuello de la pieza de conexión de la espermatida. La vaina fibrosa cubre al axonema desde el cuello hasta el principio de la pieza terminal. El anillo se desplaza distalmente desde su posición adyacente al núcleo y a lo largo de la cola hasta llegar a un punto donde se separa la pieza media de la pieza principal de la cola. Las mitocondrias se unen y forman la vaina continua que se extiende desde el cuello hasta el anillo (Knobil y col., 1994; Tortora y col., 1993).

Durante las últimas etapas de la espermiogénesis, el manguito desaparece al mismo tiempo la célula de Sertoli contribuye en la formación del citoplasma restante después la espermatida se alarga en un túbulo esferoide llamado cuerpo residual. Este lóbulo de citoplasma permanece conectado con otros cuerpos residuales por medio de puentes resultantes de la división incompleta de células germinales durante la espermatogénesis. La formación del cuerpo residual, completa la maduración final y las espermatidas alargadas están listas para liberarse como espermatozoides.

3.- ESPERMIACIÓN.

La liberación de los espermatozoides en la luz de los túbulos seminíferos se denomina espermiación. Las espermatidas alargadas orientadas en dirección perpendicular a la pared tubular, son enviadas a la luz del túbulo en forma paulatina. En el epitelio de los

túbulos queda incluido citoplasma residual a través del cual están conectados grandes grupos de espermatozoides por medio de puentes intercelulares. El rompimiento del tallo da por resultado la formación de la gota citoplásmica en el cuello del espermatozoide liberado (gota proximal) y la retención de cuerpos residuales interconectados. La siguiente liberación de espermatozoides hace que los cuerpos residuales se dispongan rápidamente cerca de las células de Sertoli. Estas células aparentemente ayudan en el reciclaje de componentes *protoplásmicos*. Las células de Sertoli no solo fagocitan los cuerpos residuales restantes del proceso de la espermatogénesis sino que también eliminan un número considerable de células germinales degeneradas. Dado que la espermatogénesis es relativamente ineficiente, gran número de células espermáticas degeneran antes de convertirse en espermatozoides (Knobil y col., 1994).

Los diferentes tipos de células que se hallan dentro de un túbulo seminífero cortado transversalmente, forman asociaciones celulares bien definidas que sufren cambios cíclicos. Se han identificado 14 tipos de asociaciones o estadios celulares en algunas especies; en el humano solo se han identificado seis (Clermont, 1963). En el toro se han descrito 12 estadios del ciclo (Hafez y col., 1989). Un ciclo completo, determinado por el tiempo de los estadios, llamado ciclo del epitelio seminífero, se define como "una serie de cambios en una área dada del epitelio seminífero entre dos asociaciones celulares o estadios". Los pasos de la espermatogénesis sirven para clasificar los diferentes estadios del ciclo. El tiempo necesario para completar un ciclo del epitelio seminífero varía según las diferentes especies, por ejemplo en el cerdo tarda nueve días; en el carnero diez; en el caballo doce y en el toro catorce días (Hafez y col., 1988).

4.- MODIFICACIONES DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA DEL ESPERMATOZOIDE DURANTE LA MADURACIÓN EPIDIDIMARIA

Cuando los espermatozoides son liberados de los túbulos seminíferos, son aun inmaduros, incapaces de moverse y aun no tienen la propiedad de fertilizar al ovocito. Los espermatozoides adquieren estas propiedades al pasar por el epidídimo, en el cual se presentan cambios substanciales en cuanto a su función, composición y organización. Los cambios funcionales ocurren en su proceso metabólico que favorece la actividad flagelar y la capacidad de unión con la zona pelúcida. Los cambios en la composición y organización de los componentes de la membrana plasmática ocurren para favorecer la

funcionalidad de la misma. Esto se ve reflejado por variaciones a nivel de superficie, por unión de lectinas, distribución de partículas intramembranales, fluidez de la membrana, composición lipídica, composición proteica y anticuerpos unidos a la superficie del espermatozoide (Knobil y col., 1994).

Los principales cambios que se presentan en la superficie del espermatozoide durante la maduración epididimaria son: un incremento en la carga neta negativa en la superficie del espermatozoide, así en los espermatozoides obtenidos de cola de epidídimo la carga negativa es mayor que la de obtenidos de la cabeza, en diferentes especies (Bedford, 1963; Bedford y col., 1973; Moore, 1979).

Las modificaciones en la cantidad de sacaridos y glicoproteínas en la superficie de los espermatozoides son probablemente las causas que originan dichos cambios en la carga neta superficial. Otro cambio importante es el aumento en la cantidad de ácido siálico (Cooper y col., 1971; Yanagimachi y col., 1972). Algunos de los métodos utilizados para estudiar los cambios en la superficie de la membrana son: las tinciones con hierro coloidal y la actividad de neuroaminidasa (Yanagimachi y col., 1972; López y col., 1987). Los estudios con lectinas proporcionan información sobre los cambios en las concentraciones de disacáridos sobre la superficie espermática durante la maduración del espermatozoide. Durante la maduración epididimaria se producen cambios importantes en el contenido lipídico de los espermatozoides. En general el contenido de lípidos como el colesterol en el espermatozoide disminuye durante la maduración epididimaria, esto ha sido reportado en cerdo, toro, carnero, cobayo, y rata (Dawson y col., 1964; Avelzano y col., 1992), la proporción colesterol/fosfolípidos y las concentraciones de fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, cardiolipina, etanolamina y plasmalógeno disminuyen en espermatozoides de carnero (Quinn y col., 1967). Sin embargo, en espermatozoides de humano ocurren incrementos en la cantidad de esteroides sulfoconjugados (Lalumiere y col., 1976). Los ácidos grasos insaturados disminuyen en los espermatozoides de carnero (Scott, 1967). Con membranas plasmáticas de espermatozoides de cerdo se comprobó que la cantidad de lípidos disminuye durante la maduración epididimaria (Evans y col., 1980). Aunque hay una disminución de colesterol, la relación en la proporción de colesterol / fosfolípidos no cambia significativamente. Hay también una disminución en la concentración de fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol además de un incremento en demosterol, sulfato de colesterol, fosfatidilcolina y polifosfoinosítidos. Se observó además

una disminución en el nivel de ácidos grasos y un aumento en diacilglicerol, pero no cambia el grado de saturación de los ácidos grasos. La membrana plasmática de la región anterior de la cabeza del espermatozoide, es particularmente rica en etanolamina y fosfoglicerolcolina (Parks y col., 1985). La cantidad de demosterol y etanolamina en esta región de la membrana plasmática disminuye, sin embargo la relación colesterol/fosfolípidos aumenta durante la maduración epididimaria.

Los cambios en la cantidad y composición de lípidos en la membrana plasmática del espermatozoide durante la maduración en el epidídimo podrían explicar el porque un espermatozoide eyaculado es más sensible al cambio térmico que uno obtenido de testículo (Hammerstedt y col., 1979). También se ha observado una disminución en la fluidez de la membrana.

4.1.- CAMBIOS EN LA COMPOSICIÓN PROTEICA.

La membrana plasmática del espermatozoide cambia en cuanto a composición de proteínas durante su maduración en el epidídimo (Knobil y col., 1994). Estos cambios pueden ser la adición de componentes nuevos a la superficie del espermatozoide, modificación de componentes preexistentes o pérdida de elementos de la superficie de la membrana. Estos han sido identificados haciendo uso de pruebas bioquímicas, para identificar dichas sustancias, también se han usado anticuerpos específicos para diferentes componentes de la superficie de la membrana. Los cambios en las glicoproteínas son probablemente las principales causas de cambios en la superficie de la membrana plasmática del espermatozoide durante la maduración epididimaria.

Nuevos componentes que aparecen en la superficie del espermatozoide han sido detectados usando estudios bioquímicos como el marcaje vectorial de espermatozoides de diferentes regiones del epidídimo. Por ejemplo con galactosa oxidasa y borohidrato de tritio pueden detectar residuos de D-glucosa y n-acetil-D-galactosamina. Glicoproteínas de 37,000 daltons han sido detectadas en espermatozoides de cola pero no en los de cuerpo de epidídimo de rata (Olson y col., 1978). Resultados similares han sido observados con iodina y lactoperoxidasa, usados para detectar residuos de tirosina (Olson y col., 1981). En otros estudios, usando técnicas similares se encontró un aumento en la cantidad de las glicoproteínas con peso molecular de 31,000 a 37,000 daltons (Knobil y col., 1994). Cambios en las proteínas de superficie del espermatozoide durante la maduración han

sido detectadas por electroforesis en geles de poliacrilamida en ratón, rata, carnero, toro y conejo (Knobil y col., 1994).

5.- MODIFICACIONES DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA DEL ESPERMATOZOIDE DURANTE LA EYACULACIÓN.

Otras alteraciones en la membrana plasmática del espermatozoide pueden ser originadas por el proceso de eyaculación ó también cuando el espermatozoide se transporta por el tracto reproductor femenino. Algunos de los cambios que ocurren en la superficie del espermatozoide como resultado de la eyaculación han sido detectados por el uso de lectinas, las cuales tienen afinidad específica por algunos glicolípidos de membrana. También se ha encontrado que antígenos de grupos sanguíneos (Edwards y col., 1964), antígenos de histocompatibilidad (Kerek y col., 1973) y factores de inmunosupresión, se pegan al espermatozoide durante la eyaculación. Los espermatozoides también pueden ser cubiertos con proteínas producidas por glándulas accesorias y presentes en el plasma seminal. Por ejemplo, los espermatozoides de humano adquieren lactoferrina (Hekman y col., 1969), ferrisplan (Koyama y col, 1983), así como proteínas de 140,000 daltons durante la eyaculación. En el conejo se han encontrado proteínas de 20,000 daltons en el eyaculado pero no en espermatozoides de epidídimo (Oliphant y col., 1979). En el toro se han encontrado proteínas de 25,000 y 14,000 daltons unidas a espermatozoides eyaculados (Vierla y col., 1980).

Durante la eyaculación una transglutaminasa dependiente de calcio producida por la próstata, puede modificar la unión de proteínas producidas por la vesícula seminal a la superficie del espermatozoide (Paonessa y col., 1984).

6.- ANATOMIA Y FISIOLÓGÍA DEL ESPERMATOZOIDE.

Los espermatozoides de mamíferos están formados principalmente por tres componentes, la cabeza, y el flagelo, los cuales están unidos por un cuello o pieza media. La cabeza esta conformada por un acrosoma, un núcleo y por estructuras del citoesqueleto y del citoplasma. El acrosoma se encuentra en la parte anterior del núcleo, esta rodeado por una membrana y contiene enzimas hidrolíticas. El núcleo del espermatozoide contiene solo un miembro de cada par de cromosomas, y la cromatina se encuentra altamente condensada. El flagelo contiene un axonema central, el cual esta

rodeado por una capa gruesa de fibras extendidas desde la parte posterior de la cabeza hasta el final de la cola. Además la parte anterior del flagelo contiene mitocondrias en vueltas en una densa capa de fibras y la parte posterior del tallo contiene una vaina fibrosa rodeada por otra capa de fibra. Tanto la vaina fibrosa como la densa capa de fibras constituyen el citoesqueleto del flagelo. Tanto el flagelo como la cabeza están cubiertos totalmente por la membrana plasmática y pequeñas cantidades de citoplasma. Aunque en general todos los animales mamíferos presentan similitudes en la anatomía del espermatozoide, existen también sus diferencias las cuales son especie específicas como son el tamaño y forma de la cabeza ó el largo y ancho de los componentes del flagelo (Knobil y col., 1994).

Las características de las estructuras especializadas del espermatozoide, son el reflejo de sus actividades funcionales (Knobil y col., 1994; Tortora y col., 1993).

El acrosoma contiene enzimas esenciales para la fertilización y el flagelo contiene la fuente de energía y la maquinaria necesaria para producir movilidad. La función de estas estructuras es asegurar que el material genético contenido en el núcleo del espermatozoide se transfiera al ovocito y para asegurar que de la combinación del contenido nuclear de ambos gametos se produzca un cigoto (Knobil y col., 1994).

6.1.- MEMBRANA PLASMÁTICA.

Todas las membranas biológicas, incluidas la membrana plasmática y las membranas internas de las células eucariotes, tienen una estructura general común: se trata de agrupaciones de moléculas lipídicas y proteicas, unidas por interacciones no covalentes. Las moléculas lipídicas están dispuestas en forma de una doble capa continua de 4-5 nm de grosor. Esta bicapa lipídica constituye la estructura básica de la membrana y actúa de barrera relativamente impermeable al flujo de la mayoría de moléculas hidrosolubles. Las moléculas proteicas están incluidas en la bicapa lipídica y median las diversas funciones de la membrana: algunas sirven para el transporte de moléculas específicas hacia el interior y exterior de la célula; otras son enzimas que catalizan reacciones asociadas a la membrana, al mismo tiempo, otras actúan como estructuras entre el citoesqueleto de la célula y la matriz extracelular y otras son receptores que reciben y traducen las señales químicas procedentes del entorno de la célula.

Todas las membranas celulares son estructuras fluidas, dinámicas: la mayoría de sus moléculas lipídicas y proteicas pueden desplazarse con rapidez por el plano de la membrana. Además, las membranas son estructuras asimétricas: La composición lipídica y proteica de sus dos caras se diferencia de manera que refleja las diferentes funciones realizadas por las dos superficies (Kuypers y col., 1996).

6.1.1.- MEMBRANA PLASMÁTICA DEL ESPERMATOZOIDE.

La membrana plasmática del espermatozoide se caracteriza por estar subdividida en regiones bien delineadas denominadas dominios que difieren en composición y función.

La naturaleza heterogénea de la superficie del espermatozoide ha sido demostrada por estudios en los que se han detectado cambios en la superficie, mediante uniones de lectinas a carbohidratos de la membrana, patrones por congelación de fractura y por unión a anticuerpos a proteínas o carbohidratos. La evidencia de que la organización y composición de la membrana plasmática varía entre diferentes regiones de la superficie del espermatozoide rebasa el concepto de que el espermatozoide es un mosaico de dominios restringidos que reflejan las funciones especializadas de la superficie y componentes citoplasmáticos del espermatozoide. El mayor de los dominios de la membrana plasmática en la cabeza del espermatozoide de la mayoría de los mamíferos está en la región acrosomal (anterior a la cabeza) y en la región postacrosomal (posterior a la cabeza). La membrana plasmática de la región acrosomal puede ser subdividida en 1.- segmento marginal (segmento apical, banda anterior y/o aro periférico) dominio que se encuentra anterior al margen del acrosoma, 2.-el segmento principal (segmento acrosomal) dominio localizado por encima de la mayor porción del acrosoma y 3.- el segmento ecuatorial (acrosoma posterior) dominio ubicado encima de la parte posterior del acrosoma. Los dominios marginal y segmento principal, a menudo son referidos como acrosoma anterior o como capa anterior. Estos dos dominios están separados por una media luna central en el caso de espermatozoides de cobayo y posiblemente de otras especies (Knobil y col., 1994).

La región postacrosomal (cabeza posterior, segmento postacrosomal). Este dominio comprende la membrana plasmática entre el margen posterior del acrosoma y el cuello. El segmento marginal y el segmento principal son dominios de la capa acrosomal de espermatozoides de cobayos y posiblemente de otras especies, esta separado por una

media luna central. El margen entre la región acrosomal y postacrosomal puede estar delimitada por el aro subacrosomal. El cual une la cabeza del espermatozoide con el margen posterior del segmento ecuatorial.

El aro posterior (aro nuclear) es la unión entre la cabeza y el tallo. La membrana plasmática del flagelo esta separada por la pieza media dominio que contiene una vaina de mitocondrias y el tallo posterior (pieza principal, tallo distal). Estos dominios están separados por un anulus, un aro de fibras que son componentes del citoesqueleto del flagelo y parece estar adherido a la superficie interna de la membrana plasmática (Knobil y col., 1994).

La membrana plasmática del espermatozoide esta compuesta de colesterol, glicolípidos, contiene también altas cantidades de plasmalógenos, fosfolípidos y otros lípidos de cadena alifática poliinsaturada. Los fosfolípidos ocupan las dos terceras partes del total de los componentes lipídicos de la membrana plasmática de espermatozoides de cerdo. La fosfatidilcolina ocupa las dos terceras partes de los fosfolípidos de la membrana plasmática de la parte anterior de la cabeza del espermatozoide de carnero. Los esteroides son los segundos lípidos más abundantes con una relación molar de colesterol/fosfolípidos de aproximadamente 0.12. Estudios realizados con fractura por congelación muestran que la cantidad de esteroles en la parte anterior del acrosoma es 4 veces más que la encontrada en la región postacrosomal en los espermatozoides de cobayo y de toro. La región postacrosoma contiene pocos esteroides o lípidos aniónicos en el espermatozoide de cobayo, aunque el poco citoplasma de la pieza media es probablemente rico en ambos. Además el sulfato de colesterol es una pequeña parte del estero total pero es un componente mayor de la membrana plasmática sobre el acrosoma del espermatozoide humano (Knobil y col., 1994).

La mayoría de los glicolípidos en los espermatozoides y de las células espermatogénicas es el sulfatogalactosilglicerolípido (SGG), el cual lo podemos encontrar también en cerebro. El SGG esta presente tanto en tallo como en cabeza de espermatozoides. Un anticuerpo monoclonal de SGG reacciona con el segmento ecuatorial y pieza media del espermatozoide vivo.

La relación fosfolípidos proteína es de 0.68 en base al peso de la membrana plasmática del espermatozoide de cerdo, sugiriendo que la cantidad de proteínas y lípidos en la membrana es aproximadamente la misma. Aunque es posible que la relación

proteína/lípidos en varios dominios de la membrana plasmática del espermatozoide sea diferente. Además, los cambios que ocurren en la membrana durante la maduración y capacitación del espermatozoide podrían tener efectos substanciales en su composición sobre todo en los diferentes dominios que contiene (Knobil y col., 1994).

6.1.2.- ASIMETRÍA DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA.

En la membrana plasmática la composición lipídica de las dos mitades de la bicapa lipídica es marcadamente diferente. En la membrana del glóbulo rojo humano, la mayoría de las moléculas lipídicas que contienen colina se encuentran en la mitad exterior de la bicapa lipídica, mientras que la mayoría de los fosfolípidos que contienen un grupo amino primario terminal, se hallan en la mitad interior. Puesto que las primeras presentan más cadenas hidrocarbonadas saturadas que las segundas, la asimetría en la distribución de los grupos de la cabeza esta acompañada por una asimetría en la distribución de las colas hidrocarbonadas. Además la fosfatidilserina, de carga negativa, está localizada en la mitad interior. Por consiguiente, existe una importante diferencia de carga entre las dos capas (Tompson, 1978).

Las moléculas lipídicas que presentan la asimetría mas marcada y constante, en cuanto a su distribución en la membrana plasmática de las células animales, pertenece a una clase de lípidos denominada glicolípidos, que contiene oligosacáridos. Estas moléculas únicamente se encuentran en la mitad exterior de la bicapa, y sus grupos azúcar quedan al descubierto en la superficie de la célula.

La formación y mantenimiento de la asimetría de las membranas biológicas es importante para sus funciones y por lo tanto para el mantenimiento de la célula (Herrman y col., 1991; Opden y col., 1979; Tompson, 1978). Los componentes estructurales de las bicapas se encuentran en equilibrio. Dicho equilibrio es un balance de dos mecanismos. Primero todos los fosfolípidos difunden pasivamente a través de la bicapa, a una velocidad relativamente baja. Segundo los amino fosfolípidos son transportados activamente de la cara externa de la membrana hacia la cara interna por la acción de una enzima denominada translocasa de aminofosfolípidos dependiente de (ATP) y Mg^{2+} la cual mantiene el equilibrio de la membrana. Estudios reportados en eritrocitos han podido demostrar que los aminofosfolípidos son transportados desde la cara externa hasta la cara interna de la membrana por la aminofosfolípido translocasa, y que este movimiento

es responsable de la distribución asimétrica de los fosfolípidos en los eritrocitos, así como en la membrana de otras células eucariontes (Devaux, 1990; Schroit y col., 1991). Cuando en la lamina externa de la bicapa aparece la fosfatidil serina, esta es rápidamente devuelta hacia la lamina interior por la translocasa de amino fosfolípidos (Kuypers y col., 1996). La aminofosfolípido translocasa es bloqueada por vanadato o cualquier inhibidor de ATP (Backer y col., 1987).

El movimiento de la cara externa hacia la cara interna de la membrana se denomina "flip" y el movimiento de los fosfolípidos de la cara interna hacia la externa se denomina "flop" (Kuypers y col., 1996).

Bajo la mayoría de las condiciones el mecanismo de "flip-flop" es extraordinariamente bajo sobre un intervalo de horas o semanas (Homan y col., 1988; Kornberg y col., 1971). El cambio de proteínas terminales del exterior al interior de la membrana se han encontrado que catalizan el paso de algunos fosfolípidos de una lamina a la otra por flip-flop, tanto dependientes de ATP y como independientes de ATP en un tiempo menor a 5 minutos (Deleke y col., 1985; Deveraux y col., 1990; Seigneuret y col., 1984). La asimétrica distribución de los fosfolípidos de la membrana puede ser explicada en base a una asimétrica distribución de cargas en las proteínas de membrana (Hubbell, 1990).

Así como las translocasas, también se ha propuesto la existencia de otras proteínas que regulan la distribución asimétrica de los fosfolípidos de las membranas y son las "flipasas" mecanismos que regulan una rápida translocación de fosfolípidos por el movimiento de flip-flop (Schneider y col, 1986).

La baja presencia de "flip-flop" de fosfolípidos puede ser incrementada significativamente por la incorporación de antibióticos como anfotericin B que forma canales (Schneider y col., 1986).

Algunas enfermedades como la anemia y algunas causadas por virus, así como la muerte celular por apoptosis pueden inducir el movimientos de "flip-flop" en la membrana plasmática, lo cual produce pérdida de la asimetría membranal, presentando fosfatidilserina en la cara externa de la membrana cuando normalmente sólo está en la cara interna (Farge, 1995). Este movimiento de "flip-flop", puede ser detectado haciendo uso de Anexina V-FICT, una proteína con afinidad a la fosfatidilseriana y la cual está unida a un fluorocromo, que puede ser detectado por citometría de flujo.

Los iones de calcio juegan un importante papel en algunos procesos fisiológicos por su habilidad para regular la estructura y función de las membranas celulares (Comar y col., 1969) y por sus acciones en algunas vías metabólicas, particularmente aquellas involucradas en los procesos de contractibilidad y metabolismo energético.

Es conocido que el incremento de la concentración del Ca^{2+} citosólico, inducido por el ionóforo A-23187, o por incorporación de Ca^{2+} al medio, produce una distribución al azar de los lípidos de la membrana (Sulpice y col., 1994; Williamson y col., 1985 y Williamson y col., 1992). El desorden que se produce en la membrana ocasiona pérdida de la asimetría de los fosfolípidos de la membrana y posteriormente la formación de vesículas. La relación entre vesiculación y translocación de fosfolípidos fue demostrado por experimentos que mostraron espontáneos brotes y vesiculaciones en liposomas después de que se les indujo redistribución transmembranales de fosfolípidos (Farge y col., 1992). Desde hace mucho tiempo se conoce que ciertos ionóforos como el A23187 son capaces de unir y transportar cationes divalentes como el Ca^{2+} a través de barreras lipídicas, incluyendo las membranas celulares (Case y col., 1974), posteriormente se demostró que este ionóforo era capaz de incrementar el contenido de cAMP en células de la médula ósea. En virtud de la conocida relación del metabolismo del calcio con el cAMP, algunos autores decidieron utilizar a este ionóforo como inductor de la capacitación espermática (Reyes y col., 1978). Actualmente se sabe que, con el uso de A-23187 se induce la reacción acrosomal por un mecanismo regulatorio intracelular que produce un rápido y masivo influjo de Ca^{2+} al interior del espermatozoide

6.2.- CABEZA DEL ESPERMATOZOIDE.

La cabeza del espermatozoide de mamífero contiene al núcleo y al acrosoma, esta rodeada por moderada cantidades de citoesqueleto y citoplasma. El acrosoma esta localizado en la parte anterior de la cabeza, en la parte posterior del acrosoma se encuentra el núcleo. Los componentes del citoesqueleto se encuentran entre el espacio del acrosoma y el núcleo y entre el acrosoma y la membrana plasmática. Los espermatozoides de la mayoría de las especies de mamíferos tienen la cabeza en forma de espátula y el núcleo y acrosoma son usualmente estructuras simétricas, sin embargo en algunas especies las extensiones del acrosoma se alargan perpendicularmente por el plano liso de la cabeza del espermatozoide. Aunque los espermatozoides son uniformes

en tamaño y forma, en algunas especies el tamaño y forma de la cabeza varía por ejemplo en espermatozoides humanos (Knobil y col., 1994).

NÚCLEO DEL ESPERMATOZOIDE.

La cromatina del núcleo del espermatozoide está altamente condensada, y su volumen es significativamente menor que el de las células somáticas. La organización, cantidad de DNA y la composición y arreglo de las nucleoproteínas son la característica principal de los núcleos de los espermatozoides (Ward y col., 1991). El proceso meiótico que ocurre durante la espermatogénesis resulta en la formación de espermatozoides que contienen únicamente una copia de cada cromosoma (Células haploides).

La mayoría de las proteínas del núcleo que se asocian con el DNA de los espermatozoides de mamíferos son las protaminas (Grimes, 1986). Estas proteínas son relativamente pequeñas (27-65 amino ácidos) y son ricas en arginina y cisteína. En los ratones los RNAs mensajeros que codifican las protaminas son producidas en las espermátidas, lo que indica que las protaminas son producto del genoma haploide (Hecht y col., 1986).

ENVOLTURA NUCLEAR.

El núcleo del espermatozoide está rodeado por una envoltura inusual. La mayor parte del núcleo no tiene poros y existe una separación únicamente de entre 7 y 10 nm entre la membrana externa e interna de la envoltura nuclear. En otras células la separación entre estas dos membranas nucleares es de 40 a 60 nm. En la parte caudal de la cabeza se encuentra el anillo posterior, en esta región se encuentran abundante cantidad de poros, los cuales presentan un patrón hexagonal de distribución. Otra característica de la membrana ahora de la parte anterior de la envoltura nuclear es la gran riqueza en partículas intramembranales distribuidas al azar (Stackpole y col., 1974).

LAMINA NUCLEAR.

La lámina nuclear es una malla de proteínas que rodea la envoltura nuclear y forma parte de la red del esqueleto nuclear que se encuentra unida a la cromatina (Gerace col., 1984). Hay cuatro proteínas que componen la lamina nuclear de células somáticas de mamíferos: Proteína laminar A, B1, B2, y C. La proteína A es de 70,000 Daltons y la

lamina C de 60,000 Daltons son similares en cuanto a la composición y secuencia de aminoácidos, pero difieren en uno de los dominios terminales (Hoger y col., 1988). Sin embargo las laminas B1 y B2 son codificadas por diferentes genes (Hoger y col., 1988). Las diferentes laminas poseen una cierta homología con proteínas de filamento intermedio (Mckeon y col., 1986) y aparentemente pertenecen a alguna familia de proteínas estructurales.

Estudios inmunohistoquímicos y de Western blot dan resultados contradictorios entre la existencia de la lamina nuclear en el ratón (Stick y col., 1982). Sin embargo en estudios bioquímicos se ha identificado una proteína de 60,000 Daltons presente en la matriz nuclear de espermatozoides en paquiteno, en la lamina nuclear de espermátidas y en espermatozoides maduros, esta proteína no se ha encontrado en la lamina nuclear de otras células somáticas (Behal y col., 1987). Experimentos de Western blot y mapeo de péptidos, sugieren que estas proteínas encontradas en las células germinales están relacionadas con las proteínas de la lamina B.

CITOESQUELETO DE LA CABEZA DEL ESPERMATOZOIDE.

La estructura del citoesqueleto está localizado en tres regiones de la cabeza del espermatozoide de mamíferos. El citoesqueleto subacrosomal, localizado entre el acrosoma y el núcleo, El citoesqueleto postacrosomal está entre el núcleo y la membrana plasmática posterior del acrosoma y el citoesqueleto para-acrosomal está presente entre la punta anterior y la superficie convexa del acrosoma y la membrana plasmática del espermatozoide.

EL ACROSOMA.

El acrosoma se origina del aparato de Golgi en las espermátidas y contiene las enzimas necesarias para que el espermatozoide pueda penetrar al interior del ovocito y consumar la fertilización. Esta estructura membranosa se encuentra situada en la parte anterior de la cabeza del espermatozoide.

La estructura del acrosoma la componen: la membrana acrosómica interna, membrana acrosómica externa y contenido acrosomal, la membrana acrosomal interna se encuentra por encima de la parte anterior de la membrana nuclear. La membrana acrosómica externa está rodeada por la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide. El

acrosoma consiste de dos segmentos la capa acrosomal (acrosoma anterior) y el segmento ecuatorial (acrosoma posterior), los nombres que reciben estas regiones también las reciben algunos dominios de la membrana plasmática. Durante la reacción acrosomal, la membrana plasmática del espermatozoide se fusiona con la membrana acrosómica externa formando vesículas, y la mayoría del contenido acrosomal se descarga. La membrana acrosomal interna y segmento ecuatorial se mantiene hasta la fusión del espermatozoide con el ovocito, lo cual ocurre en la mayoría de las especies (Knobil y col., 1994). La forma y tamaño del acrosoma varía de acuerdo con la especie, así como también difiere la distribución y relativa prominencia de estos dos segmentos (Fawcett, 1970).

El segmento ecuatorial forma una banda por encima del ecuador de la cabeza del espermatozoide. El segmento ecuatorial puede cubrir la mayor parte de la superficie lateral de la cabeza. La porción de capa acrosomal que se extiende mas allá del margen anterior del núcleo es el segmento marginal (segmento apical, banda anterior, anillo periférico) y la porción que se encuentra por encima del núcleo es el segmento principal (segmento acrosomal). En el humano, mono, toro, cerdo, conejo y murciélago, el acrosoma es relativamente pequeño y no se aprecia una extensión más allá del núcleo. Sin embargo en el cobayo, chita y ardilla de campo, el acrosoma presenta un largo segmento apical (Fawcett y col., 1969; Fawcett, 1970).

Por microscopía electrónica se ha revelado que el segmento marginal del acrosoma presenta una forma compleja. La forma del acrosoma es característica de cada especie (Fawcett, 1970). La forma final del acrosoma puede ser el resultado de la fuerza extrínseca que ejercen los componentes del citoesqueleto en la espermátida y/o el citoplasma de las células de Sertoli (Camatini y col., 1991) ó por la fuerza intrínseca del núcleo (Furukawa y col., 1993). Acrosomas de espermatozoide de chinchilla y cobayo continúan teniendo diferenciación morfológica aún después de la espermatogénesis y la forma definitiva, no es alcanzada hasta que el espermatozoide llega a la porción distal de la cola del epidídimo (Fawcett y col., 1969).

La membrana del acrosoma, en particular la del segmento ecuatorial, contiene partículas en forma de cristales, que dan una apariencia granular. Semejantes formas han sido reportadas en el espermatozoide de humano, conejo, toro, ratón, rata, cobayo y de otros mamíferos (Koehler, 1972). Aunque, la membrana acrosomal externa del acrosoma

parece ser una estructura frágil, capaz de ser desplazada o desprendida durante la reacción acrosomal, también tiene una apariencia gruesa debido a una capa densa de electrones en la superficie interior (Olson y col., 1985). Esta capa interior de la membrana externa del acrosoma, ha sido aislada de espermatozoide de toro y se ha demostrado que esta compuesta principalmente de tres glicoproteínas de un peso molecular de 290,000, 280,000 y 260,000, así como también se han encontrado proteínas de 115,000, 81,000, 58,000 y 46,000 daltons (Olson y col., 1985). Lectinas unidas al interior de la superficie de la membrana, como la WGA se une a los componentes de 46,000 daltons, lo cual sugiere que las moléculas glicosiladas pueden ayudar a estabilizar la membrana y tener una función en el proceso de fusión de la reacción acrosomal (Olson y col., 1985).

La membrana acrosomal interna formada en las etapas tempranas de la espermatidias por la fusión de los gránulos proacrosomales, se mantiene junto con la membrana plasmática del espermatozoide durante la reacción acrosomal. La membrana acrosómica externa se caracteriza por ser muy resistente, en espermatozoide de ratón y de conejo se han utilizado tratamientos químicos y físicos como el uso de detergentes y sonicación para tratar de separarla (Thakkar y col., 1983). Sin embargo la membrana acrosómica interna de espermatozoides de cerdo es muy sensible a tratamientos con proteinasas (Russell y col., 1979). En espermatozoides de hamster se ha encontrado que las lectinas se unen a la superficie de la membrana acrosómica interna lo cual indica la presencia de glicoproteínas (Schwarz y col., 1976).

CONTENIDO DEL ACROSOMA.

El acrosoma es el único organelo del espermatozoide que es requerido para la fertilización en los mamíferos. Múltiples enzimas están presentes en el acrosoma, incluyendo hidrolasas ácidas, que comúnmente se encuentran en lisosomas y otras enzimas específicas de la célula espermática.

Algunas de las enzimas que se encuentran en el interior del acrosoma son: N-acetilglucosaminidasa, Fosfatasa ácida, Acrosina, Arilaminidasa, Arilsulfatasa A, Aspartilaminidasa, Calpaina II, Cathepsina-D- (semejante a Peptidasa), Colagenasa- (semejante a Peptidasa), Esterasa no específica,-Galactosidasa, Hialuronidasa, Neuroaminidasa, Fosfolipasa A₂ fosfolipasas C y otras enzimas mas. Aunque se ha descrito el acrosoma como un lisosoma especializado, el acrosoma también tiene

características de una vesícula secretora. Durante la reacción acrosomal el contenido acrosomal es liberado por una exocitosis mediada por calcio en respuesta a señales específicas. Después de la liberación y activación de las enzimas, el espermatozoide penetra la zona pelúcida que rodea al ovocito, un proceso que puede ser bloqueado por proteasas inhibitorias (Muller y col., 1981).

EI FLAGELO.

El flagelo del espermatozoide de mamífero consta de cuatro diferentes segmentos: la pieza de conexión (cuello), pieza media, pieza principal y pieza final. Los componentes estructurales principales del flagelo son el axonema, la vaina de mitocondrias, la fibra densa exterior y la vaina fibrosa. El axonema esta compuesto de "9+2" túbulos complejos que se extienden por todo lo largo del flagelo. La fibra densa exterior se encuentra adyacente al axonema y se extiende por la parte posterior del cuello y la pieza principal. En la pieza media se encuentran las mitocondrias y en la pieza principal se encuentra la vaina fibrosa. Las mitocondrias se encuentran entre la membrana plasmática y las densas fibras exteriores de la pieza principal.

El flagelo proporciona la fuerza necesaria para que el espermatozoide alcance al ovocito y lo pueda fecundar. Los diferentes elementos del flagelo generan una forma de dobles en forma de ola que produce una fuerza de propagación que va des de la base hasta la punta. El espermatozoide humano tiene una longitud de aproximadamente 60 μm de los cuales corresponden 55 μm al flagelo. Sin embargo la longitud del flagelo varia con la especie. El espermatozoide de conejo tiene una longitud de 46 μm , el espermatozoide de ratón tiene 120 μm , el de la rata tiene 190 μm y el espermatozoide de hamster tiene una longitud de 250 μm . El flagelo del espermatozoide humano es ancho, tiene un diámetro de 1 μm en el cuello.

7.- CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA.

La fertilización exitosa entre gametos es un mecanismo complejo que comprende una serie de eventos regulados por receptores. Durante la década pasada, la aplicación de nuevas tecnologías en el campo de la biología de la reproducción, como el desarrollo de anticuerpos monoclonales, análisis bioquímico de mecanismos reguladores de la célula y

biología molecular, han permitido la interpretación de algunos de los eventos involucrados en fertilización y de este modo permiten un mejor entendimiento de estos mecanismos.

En los mamíferos incluyendo al humano, los espermatozoides presentan una serie de cambios antes de que ellos adquieran su capacidad de fertilizar. Estos cambios se conocen como capacitación y reacción acrosomal. La capacitación se presenta después de la eyaculación y ocurre fisiológicamente en el tracto reproductor femenino. Puede ser definida como una serie de cambios bioquímicos en la membrana plasmática que preparan al espermatozoide para la reacción acrosomal (Austin, 1967). Durante la capacitación se presenta una remoción o alteración gradual de glicoproteínas periféricas, una redistribución de glicoproteínas integrales, la reducción de colesterol de la membrana, y cambios en la distribución y composición de fosfolípidos (Yanagimachi, 1988). El calcio extracelular es requerido para completar la capacitación, aunque también es requerido para realizar la exocitosis acrosomal. La concentración de calcio intracelular aumenta durante la capacitación mediada por una ATPasa dependiente de calcio (Fraser y col., 1992). Una acción directa del calcio sobre la membrana es la de permitir la fusión entre la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa y propicia la reacción acrosomal. El calcio causa una desestabilización sobre la membrana plasmática y provoca la formación de intermediarios con capacidad de fusión (Chetham y col., 1990). En el espermatozoide humano también se ha demostrado que el sulfato de colesterol es un componente de la membrana plasmática y se ha calculado que representa hasta un 20% del área superficial del acrosoma (Langlais y col., 1981). Algunos de los sulfatos de colesterol pueden ser removidos durante la capacitación y de este modo proporcionar al espermatozoide la capacidad de fusión. El resto de sulfato de colesterol puede ser neutralizado por el aumento en la concentración de calcio, iniciando la reacción acrosomal.

Una vez finalizado el proceso de capacitación, la reacción acrosomal puede ser inducida por medio del estímulo apropiado. *In vivo*, la capacitación parece ser necesaria para que el espermatozoide pueda pasar a través de las células del cumulus que rodean al ovocito. El cumulus parece ser un filtro para seleccionar a los espermatozoides con capacidad de fertilizar (Cummins y col., 1986; Saling, 1989; Storey y col., 1984). Después de pasar por el cumulus el espermatozoide se une a la zona pelúcida vía receptores que se encuentran en la membrana plasmática por encima del acrosoma. Únicamente en algunas especies

como ratón y hamster el espermatozoide con acrosoma intacto y capacitado es capaz de unirse a la zona pelúcida (Saling y col., 1979), sin embargo en otras especies como el conejo y el cobayo se ha demostrado que espermatozoides que previamente han realizado la reacción acrosomal son capaces de mantener la capacidad de unión por la zona pelúcida por varias horas (Fleming y col., 1982; Kuzan y col., 1984). Sobre el espermatozoide humano existen reportes contradictorios (Morales y col., 1989; Singer y col., 1985) La reacción acrosomal representa un absoluto requerimiento para completar exitosamente la fertilización. Únicamente los espermatozoides reaccionados son capaces de pasar a través de la zona pelúcida y subsecuentemente fusionarse con la membrana plasmática del ovocito y dar origen a un organismo. Además los espermatozoides que presentan reacción acrosomal prematura pierden el potencial fertilizante, los espermatozoides que sufren la reacción acrosomal antes de pasar por el cumulus son incapaces de atravesarlo y por lo tanto de fecundar al ovocito (Cherr y col., 1986; Cummins y col., 1986). Estas observaciones sugieren que existe un mecanismo de control para asegurar la exitosa fertilización.

El espermatozoide que ha sido madurado en el epidídimo es capaz de moverse activamente, sin embargo ellos todavía no son capaces de fertilizar al ovocito. Ellos adquieren esta propiedad después de haber permanecido en el tracto reproductor femenino por un tiempo determinado y durante este lapso los componentes estructurales del espermatozoide cambian, a este proceso se le conoce como capacitación. El cual es un proceso fisiológico natural que le ocurre al espermatozoide de mamífero después de haber sido eyaculado y que le da la capacidad fecundante.

En 1949, Noyes, Finkk y Rocke (Knobil y col., 1994) descubrieron que espermatozoides de conejo recién eyaculados en la hembra, los cuales fueron colectados del tracto reproductor femenino, eran incapaces de fertilizar a los ovocitos, mientras que aquellos espermatozoides que permanecían en el oviducto de hembras por un tiempo de entre 4 y 8 hrs de almacenados sí podían fertilizarlos. Sin embargo el descubrimiento de la capacitación se otorgó a los investigadores Chang y Austin en 1951-1955, al documentar evidencias experimentales de la necesidad de la capacitación en el conejo y rata. Chang (1955), demuestra que cuando se recuperan espermatozoides de útero a las 6, 12 y 16 horas de haber fecundado a la hembra y posteriormente estos transferidos al oviducto de otras hembras a las que se les indujo previamente ovulación, obtenía un 38, 54, y 77% de

los ovocitos fertilizados respectivamente (citado por Barros, 1974). Otras evidencias presentadas por Adams y Chang (1962) indican que espermatozoides incubados en el oviducto tardan entre 10 y 11 horas para capacitarse, sin embargo cuando estos son depositados directamente en el útero el tiempo necesario para la capacitación disminuye, lo cual indica que el útero es el órgano más apropiado para que se realice la capacitación.

7.1.- FACTORES QUE PARTICIPAN EN LA CAPACITACIÓN.

Desde hace 40 años que se descubrió la capacitación hasta la fecha aun no se conocen totalmente sus bases moleculares, esto como consecuencia de que existen varios factores que participan en dicho proceso fisiológico y a que no hay algún parámetro que sea producido durante la inducción de esta (Bedford, 1983; Meizel, 1985). Es importante recalcar que durante la capacitación se producen cambios estructurales importantes en el espermatozoide, tales como la supresión de componentes superficiales que se adhieren al espermatozoide al entrar en contacto con el plasma seminal, factor(es) decapacitante(s) (Oliphant, 1979, Legault y col., 1979); disminución de la carga neta superficial del espermatozoide (Rosado y col., 1973), probablemente debida a la supresión de ácido siálico (Rosado y col., 1973) y de algunos compuestos sulfatados (Legault y col., 1980); cambios en la distribución de carbohidratos superficiales, lo cual ha sido demostrado por la fijación de lectinas (Tesarik, 1986), cambios en la organización de partículas intramembranales (Tesarik, 1986) probablemente debidas a cambios importantes en la fluidez de la membrana plasmática del espermatozoide (Mercado y col., 1974; Friend, 1984) cambios en la estructuración de la membrana de la cabeza del espermatozoide (Delgado y col., 1976). La totalidad de estos cambios se ven reflejados en cambios fisiológicos, de los cuales uno de los más importantes es el aumento en la permeabilidad de la membrana del espermatozoide a los iones de calcio (Langlais y col., 1985; Meizel, 1985), a los cuales parece ser normalmente impermeable (Clegg, 1983).

Puede considerarse que la capacitación termina cuando las modificaciones estructurales de las membranas acrosomales permiten iniciar los mecanismos de fusión membranaral que constituyen la reacción acrosomal. Bedford en 1983, propuso que la reacción acrosomal no requiere ningún estímulo específico, sino que, una vez que los espermatozoides son capacitados, el proceso continuará dependiendo sólo del tiempo y

de concentraciones adecuadas de calcio extracelular, hasta que se realice la reacción acrosomal.

Una vez depositado el semen en el tracto reproductivo este adquiere una mayor movilidad y se dirige hacia el sitio de fecundación (ampula).

El sitio donde el espermatozoide se capacitará depende del lugar donde se haya depositado el semen. El semen que fue depositado en el útero, comienza el proceso de capacitación en el mismo útero y se completa o termina en la parte baja del istmo. Sin embargo las especies donde el semen se deposita en el fondo de la vagina la capacitación se inicia desde el mismo momento en que el espermatozoide entra en contacto con el moco cervical y el uterino hasta llegar al istmo (Knobil y col., 1994).

MOVILIDAD.

En diferentes especies de mamíferos se han identificado cambios característicos en la movilidad espermática asociados con la etapa final de la capacitación y el disparo de la reacción acrosomal, tanto *in vivo* como *in vitro*: estos cambios en el patrón de movilidad se conocen genéricamente con el término de "hiperactivación". Proceso descrito por primera vez en el hámster, y evidenciado en numerosas especies. Tras la capacitación y antes de comenzar la reacción acrosomal, los espermatozoides adquieren un movimiento muy vigoroso, conocido con el término en inglés de "Wiplash Motility" (Movilidad tipo látigo), caracterizado por un gran aumento en la frecuencia y en la amplitud de movimientos del flagelo, lo que le proporciona un gran empuje para la penetración a través de la zona pelúcida (Gafo y col., 1994). La importancia funcional de la hiperactivación puede incluir la regulación del transporte espermático en el oviducto y la generación de la fuerza requerida para la penetración de la capa de células de la granulosa y de la zona pelúcida en el ovocito.

La movilidad espermática es considerada como uno de los parámetros importantes en el proceso de fertilización, ya que participa tanto en el transporte de los espermatozoides hacia la región ampular de la trompa de falopio, así como durante la interacción de los gametos y los eventos previos a la fusión de los mismos. El primer cambio en el patrón de movilidad que se observa *in vitro* después de la eyaculación, coincide con la eliminación del plasma seminal y la suspensión de los espermatozoides en alguna solución fisiológica o medio de cultivo. La capacitación se puede realizar *in vitro* sin ninguna contribución del

tracto reproductor femenino. Para inducir la capacitación se han utilizado fluido folicular, suero sanguíneo los cuales contiene sustancias que pueden causar también la reacción acrosomal.

La naturaleza de los factores propios de la secreciones del aparato reproductor femenino responsables del control de la capacitación se ha estudiado en diferentes especies de mamíferos, sin embargo aun no se conocen con exactitud. Se han propuesto algunas moléculas como factores capacitantes o reguladores de la capacitación *in vitro* como es el caso de las siguientes enzimas: amilasa, glucuronidasa, acetil hexosaminidasa, proteinasas, neuroaminidasas, aril sulfatasa, fucosidasas, anhidrasa carbónica, esteroide sulfatasas); glicosamin glicanos; catecolaminas; hormonas esteroides (estradiol, progesterona). proteínas (albúmina, lipoproteínas); nucleotidos ciclicos (AMPc, GMPc); aminoácidos (taurina, hipo taurina, histidina); sustratos y otras moléculas más. Sin embargo se ha demostrado que ninguna de estas sustancias es indispensable para capacitación espermática *in vitro*. ejemplo para el hámster es necesaria adicionar al medio un factor de movilidad espermática (SMF) el cual se ha relacionado con un incremento en el tiempo de vida del esperma.

La capacitación espermática *in vitro* en el bovino es facilitada por la presencia de heparina, la cual ayuda a remover los componentes del plasma seminal de la superficie del espermatozoide.

7.2.- CAMBIOS LIPÍDICOS DURANTE LA CAPACITACIÓN.

La fluidez y la permeabilidad de la membrana plasmática dependen en parte de la composición de la bicapa lipídica, fundamentalmente de la relación colesterol -fosfolípidos (c/f). Es por esta razón por la que la capacitación se haya relacionado con cambios en la composición lipídica de la membrana, particularmente con disminución en la cantidad de colesterol y una disminución concomitante en la relación molar c/f (Davis, 1981; Huacuja y col., 1981; Langlais y col., 1981). Se ha demostrado, utilizando fantasmas de eritrocito, que el cambio en la relación c/f produce cambios notables en la fisiología membranal, particularmente en la permeabilidad a iones (Cooper, 1975), en la fluidez, fragilidad de la membrana y en la movilidad intramembranal de los lípidos (Demel y col., 1976).

Algunos autores como Albert y col. (1981) han propuesto que el intercambio de colesterol entre la membrana plasmática del espermatozoide y los medios utilizados para la

capacitación es compatible con el carácter reversible del proceso de capacitación, puesto que la adición de factores decapacitantes, tales como el colesterol o sulfatos de esteroides presentes en el plasma seminal, provocarían un aumento en la fijación del colesterol por la membrana del espermatozoide y la elevación concomitante de la relación *c/f* (Davis, 1981; Huacuja y col., 1981).

Demel y col. (1976) han demostrado, que si se forman bicapas de fosfolípidos y después se introduce en ellas colesterol en cantidades variables, se observa que la estabilidad de la membrana aumenta, y su permeabilidad disminuye, según se aumenta la concentración de colesterol. Esta dependencia es más notable cuando la constitución de la bicapa contiene 50 por ciento de ácidos grasos saturados

Davis (1982) y Langlais y col. (1981) proponen un mecanismo para explicarse la capacitación, y consistió en afirmar que los medios capacitantes actúan induciendo la liberación de colesterol de la membrana del espermatozoide, lo cual provocaría una disminución en la relación *c/f* y un aumento concomitante de la permeabilidad de la membrana, permitiendo particularmente la entrada de calcio. Ha sido demostrado que el colesterol de la membrana del espermatozoide se intercambia fácilmente con el colesterol extracelular (Huacuja y col., 1981) de manera que la relación *c/f* del espermatozoide muestra un alto índice de correlación con la relación *c/f* del medio de suspensión, siempre y cuando éste sea un medio biológico, puesto que se sabe el colesterol no existe libre en solución, sino que siempre es acarreado por proteínas específicas (Levy, 1981).

En el espermatozoide humano, particularmente en la cabeza, la cantidad de colesterol presente en la estructura membranar, disminuye significativamente la relación *c/f*, provocando la desestabilización de la estructura proteica de la membrana facilitando probablemente el transporte de calcio al interior del espermatozoide. Al mismo tiempo, estas mismas condiciones de incubación inducen un aumento substancial en la actividad de la fosfolipasa A2, con lo cual quedan establecidas las condiciones necesarias para que se inicie la fusión membranar que caracteriza la reacción acrosomal (Knobil y col., 1994).

En las membranas biológicas se ha demostrado que alteraciones en la organización en los lípidos de membrana pueden ser inducidas por cambios de temperatura relacionados con la transición de fases de cristalino a gel, líquido y viceversa (Wolf y col., 1990). El cambio de transición de fases en el espermatozoide provocado por la congelación y descongelación del semen produce cambios en la distribución de los componentes

estructurales de la membrana plasmática, dichos cambios están asociados con permeabilidad y fusión membranal (Holt y col., 1986).

La composición de los fosfolípidos y su relación con el colesterol regulan la fluidez y permeabilidad iónica de las membranas biológicas y se ha reportado que estos dos factores cambian durante la capacitación. En el caso de los espermatozoides humanos existen evidencias de que la capacitación *in vitro* involucra la eliminación de colesterol de la membrana plasmática y que la pérdida de lípidos membranales durante este evento parece ser un fenómeno reversible asociado con la presencia de proteínasceptoras de esteroides en el medio de incubación (Knobil y col., 1994).

Cuando se incuban espermatozoides con un medio capacitante químicamente definido y después se estudia la concentración de lípidos (colesterol y fosfolípidos) en las células completas y fraccionadas, se observa que el colesterol y la relación colesterol-fosfolípidos disminuye en un 20 y 30% en la fracción de la cabeza. La adición de líquido folicular o suero sanguíneo a este medio, sin embargo produce la eliminación del 40-50% del colesterol membranal, el cual es atrapado por las lipoproteínas y albúmina presente en estas secreciones.

Las alteraciones físicas y/o químicas de la bicapa de lípidos membranales durante la capacitación parece tener como resultado adicional la inducción de redistribución en las partículas intramembranales detectadas mediante criofractura (proteínas intrínsecas). Se ha observado la aparición de zonas carentes de estas partículas, las cuales a diferencia de las áreas circunvecinas ricas en partículas intramembranales, carecen de colesterol y lípidos aniónicos (por ejem. cardiolipina) y por lo tanto tienen propiedades biofísicas y fisiológicas diferentes, que están relacionadas con el transporte de iones y la fusión membranal (Knobil y col., 1994).

8.- REACCIÓN ACROSOMAL.

La reacción acrosomal es un proceso fisiológico natural que se presenta en el espermatozoide después del proceso de capacitación. Mientras la capacitación es un proceso reversible la reacción acrosomal es un proceso irreversible. Durante los últimos años han sido encontrados diferentes factores que estimulan la reacción acrosomal, de los cuales las proteínas de la zona pelúcida son consideradas como el principal factor fisiológico *in vivo*. Las hormonas esteroides como la progesterona se ha relacionado con

la inducción de cambios importantes en los espermatozoides durante la reacción acrosomal, al igual que la progesterona el calcio juega un papel importante en este evento fisiológico. El flujo de calcio es inducido específicamente por progesterona en espermatozoides capacitados. Solo los espermatozoides que están capacitados son capaces de continuar la reacción acrosomal. Tanto la progesterona como la zona pelúcida son dos sustancias, que se ha demostrado, son esenciales, para desencadenar una serie de señales intracelulares que culminan con la reacción acrosomal. Además agentes químicos como ionóforos de calcio A⁺-23187 han sido usados como reguladores de este evento. Algunos nucleótidos cíclicos como la galactosiltransferasa y una proteína espermática proteintirosincinasa y de una nueva proteína llamada SAA-1 que fue detectada por primera vez en espermatozoides de humanos, son algunas de las moléculas relacionadas también con la reacción acrosomal (Brucker y col., 1995).

8.1.- FISIOLOGÍA DE LA REACCIÓN ACROSOMAL.

El acrosoma es un organelo derivado del aparato de Golgi el cual se desarrolla durante la espermatogénesis, y puede ser descrito como un granulo secretor situado en la cima de la cabeza del espermatozoide. Recientes investigaciones sobre las características biofísicas de la reacción acrosomal se realizaron usando como modelo de estudio a cobayos y carneros principalmente haciendo uso de microscopía electrónica (Bearer y col., 1982; Fléchon, 1985; Fléchon y col., 1986)

Los espermatozoides son células altamente polarizadas y tienen distintas estructuras denominadas dominios. Una de las características importante es la estrecha proximidad de dos macro dominios en la cabeza del espermatozoide, denominados capuchón acrosomal y el segmento ecuatorial adyacente y post-acrosomal, estos tienen características estructurales diferentes. Durante el proceso de capacitación se observa un aumento en la fluidez de la membrana de la región del capuchón, mientras que la región ecuatorial adyacente y post-acrosomal no se ven afectadas por estos cambios. También se ha demostrado que hay un aumento en la concentración de lípidos aniónicos en la membrana del capuchón favoreciendo la capacidad de fusión (Bearer y col., 1982). Se conoce que los fosfolípidos aniónicos tienen potencial fusogénico, las membranas de vesículas que incorporan lípidos aniónicos se fusionan tempranamente con la introducción de cationes divalentes. Esto sugiere que el aumento en la concentración de fosfolípidos

aniónicos sobre la región del capuchón acrosomal fue debida a una combinación del efecto de "flip flop" de lípidos aniónicos, esto es, pasar de la cara interna a la externa de la membrana plasmática y en la cual podría estar involucrada la participación de la fosfolipasa A2 (PLA2) (Bearer y col., 1982; Flechon y col., 1986). La reacción acrosomal parece ser una exocitosis comparándola con otras células, aunque con algunas diferencias inusuales. La fusión membranal en la exocitosis involucra un organelo esférico secretor unido a la membrana en una área limitada. El acrosoma sin embargo con su largo tamaño se encuentra en estrecho contacto con la membrana y hay una liberación de su contenido que pasa por aberturas que se encuentran por todo lo largo de esta área. En modelos animales se demostró que ocurren cambios morfológicos en la membrana por encima del acrosoma antes de la fusión. Eventos tempranos que ocurren en la reacción acrosomal son: la presencia de partículas libres "claros" en la membrana encima de la región acrosomal, con agregación de partículas intramembranales entre y alrededor de los "claros". La fusión entre la membrana plasmática y acrosomal externa, comienza en una área limitada entre el borde y segmento ecuatorial y anterior del acrosoma y continua extendiéndose de lado por encima de la cabeza. Esto produce una desestabilización del capuchón acrosomal y liberación de del contenido acrosomal (Brucker y col., 1995).

La morfología de la reacción acrosomal ha sido descrita por algunos investigadores haciendo uso de microscopía electrónica (Thomas y col., 1988; Yudit y col., 1988). Una observación interesante hecha hace algunos años (Yudit y col., 1988) ha sido la similitud encontrada en el proceso de la reacción acrosomal en el humano con la de los demás especies de mamíferos: La reacción acrosomal en el humano consiste en la formación de poros, por la fusión de membranas, lo que permite la salida a través del poro principalmente de hialuronidasa y acrosina. La liberación de enzimas facilita la penetración del espermatozoide a la zona pelúcida. La reacción acrosomal no es una verdadera exocitosis, aunque los mecanismos que la regulan son similares a eventos de exocitosis que operan en otros sistemas celulares. Una vez completada la vesiculación, estas vesículas permanecen cerca del acrosoma por un corto tiempo y después se dispersan (Brucker y col., 1995).

8.2.- INDUCCIÓN DE LA REACCIÓN ACROSOMAL.

El estímulo desencadenante de la reacción acrosomal está todavía en debate, la reacción acrosomal puede ser inducida por varias sustancias encontradas cerca del ovocito, como líquido folicular (Mukerjee y col., 1972; Tesarik, 1985), líquido del cumulus oophorus (Tesarik, 1985; Siiteri y col., 1988) y líquido secretado por células de la granulosa (Siiteri y col., 1988). Se ha demostrado en humanos, que la zona pelúcida es el sitio de unión del espermatozoide y posteriormente induce la reacción acrosomal (Cross y col., 1988; Lee y col., 1992; Morales y col., 1989). Se demostró en humanos, que los espermatozoides con acrosoma intacto unidos a la zona pelúcida pueden iniciar la reacción acrosomal así también espermatozoides que han iniciado la reacción pueden unirse a la zona y continuar con la reacción (Morales y col., 1989). También se conoce que las progesterona, progestinas como la 17 α -hidroxiprogesterona, inducen la reacción acrosomal en espermatozoides de humano (Osman y col., 1989). Las células del cumulus y el líquido folicular han sido sugeridos como fuentes de progesterona en el sitio de fertilización.

La progesterona ha sido encontrada en líquido folicular en concentraciones capaces de inducir la reacción acrosomal (Osman y col., 1989). Agentes inductores de la reacción acrosomal han sido estudiados en líquido folicular, como proteínas unidas a progesterona (Thomas y col., 1989). Las células del cumulus también han sido consideradas como posibles fuente de progesterona, se ha estimado en 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de progesterona producida por el cumulus (Osman y col., 1989), la cual es una dosis suficiente para inducir la reacción acrosomal. La inducción de la reacción acrosomal por estos agentes requieren de que los espermatozoides hayan sido capacitados previamente. Sin embargo cuando se usa el ionóforo de calcio A-23187 no es necesario que el espermatozoide haya sido capacitado, ya que este reactivo altera el mecanismo regulatorio intracelular, permitiendo la entrada rápida y masiva de calcio extracelular, lo cual culmina con la reacción acrosomal. Aunque la reacción producida por ionóforos no es considerada como fisiológica. También es importante considerar la falsa reacción acrosomal, la cual se puede presentar después de la muerte del espermatozoide. Por lo tanto es imperante distinguir entre la falsa y la verdadera reacción acrosomal. Para considerar a la reacción acrosomal como fisiológica, es necesario que primero se haya realizado el proceso de capacitación (Brucker y col., 1995).

8.3.- EFECTOS DEL CALCIO EN LA REACCIÓN ACROSOMAL.

El Ca^{2+} es indispensable en la inducción de la reacción acrosomal, puede desencadenar la fusión en células así como en liposomas, se conoce que hay incrementos en la concentración de calcio intracelular poco antes de la reacción acrosomal y la carencia de calcio puede impedir la reacción. Existen indicadores de la concentración de calcio en células pequeñas (Tsien y col., 1980, 1981; Grynkievich y col., 1985). El flujo de calcio en espermatozoides puede ser medido. Restos de calcio y aumentos en su concentración producidos por el efecto del ionóforo divalente fueron medidos por primera vez en espermatozoides de humano por Irvine y Aitken (1986) usando quin 2. Subsecuentemente aumentos transitorios en la concentración de calcio intracelular fueron medidos usando fura 2, después fueron comparados con espermatozoides humanos con el estímulo apropiado (Blackmore y col., 1990; Thomas y col., 1988).

El líquido folicular humano ha demostrado ser un inductor del aumento de calcio intracelular libre. Algunos agentes inductores de la reacción acrosomal que se encuentran en el líquido folicular fueron descubiertos por purificación, identificándose proteínas unidas a 4-pregnen-17 α -ol-3,20-dione (Progesterona) y 4-pregnen-17- α -ol-3-20-dione (17 α -hidroxiprogesterona). Ambas sustancias demostraron inducir la reacción acrosomal en espermatozoides humanos en un tiempo de entre 10 minutos (Osman y col., 1989). Los cambios de calcio intracelular desencadenados por la adición de progesterona y 17 α -hidroxiprogesterona fueron investigados por Blackmore y col. (1990). Usando el indicador fluorescente fura 2, con lo que demostró que la progesterona y la 17 α -hidroxiprogesterona causan un incremento inmediato en la concentración de calcio libre citosólico tanto en espermatozoides humanos capacitados como no capacitados. Esto parece ser un efecto específico de las progestinas, se conocen otros esteroides semejantes a testosterona, corticosterona, estradiol, estrona, dehidroepiandrosterona, 20 α -hidroxi-pregнено-3-ona, androstendiona y pregnenolona, que no tienen efecto. El bloqueo de calcio extracelular por agentes quelantes o por bloqueadores de canales de calcio han demostrado que la reacción acrosomal es dependiente de la presencia de calcio extracelular (Thomas y col., 1988). La inhibición selectiva del flujo de calcio producido por la inducción de progesterona como el La^{3+} proporciona evidencias de un canal de calcio funcional en el espermatozoide de humano que esta involucrado en la señalización. Aunque el influjo de

calcio también ocurre en espermatozoides no capacitados (Blackmore y col., 1990) estos no continúan con la reacción acrosomal.

En el pasado se aceptaba que los espermatozoides maduros no tenían alguna provisión de calcio intracelular y que las fuentes de calcio para la reacción acrosomal escaseaban en el medio externo. Nuevos reportes, sugieren una movilización de provisiones de calcio intracelular y que pueden estar involucradas en la reacción acrosomal de espermatozoides humanos (Blackmore, 1993; Meizel y col., 1993).

Se encontró recientemente que la membrana nuclear de células de hígado poseen un mecanismo regulador de la concentración de calcio, controlando la bomba ATPasa-calcio (Lanini y col., 1992). En el espermatozoide ha sido sugerida la existencia de una bomba similar calcio-ATPasa de membrana, la cual es sensiblemente inhibida por tapsigargina y por un promotor tumoral lactona sequisterpeno (Blackmore, 1993). Otros posibles sitios proveedores de calcio sensibles a tapsigargin incluyen al núcleo y acrosoma (Meizel y col., 1993).

En espermatozoides de "*Sea urchin*" al parecer el gel que cubre los ovocitos induce reacción acrosomal por un influjo de calcio que pasa por canales de calcio operados por voltage (Schackman., 1978,1981). Hay evidencias que muestran aumentos transitorios en influjo de calcio en espermatozoides que no han iniciado la reacción acrosomal y entran en contacto con las proteínas de la zona, como espermatozoides de ratón y de bovino (Clark y col., 1993; Storey y col., 1992). La existencia de canales de calcio dependientes de voltage en espermatozoides de mamífero han sido sugeridos (Babcock y col., 1987; Cox y col., 1989). La activación de canales de calcio dependientes de voltage ha sido recientemente demostrado ser un requisito para la realización de la exocitosis acrosomal inducida por zona pelúcida en carnero y bovino(Florman y col., 1992).

8.4.- RECEPTORES INVOLUCRADOS EN LA REACCIÓN ACROSOMAL.

La galactosiltransferasa es una enzima localizada entre la membrana plasmática del espermatozoide y tiene una función definida en el reconocimiento entre gametos de ratón (Shur y col., 1988). Hace ya tiempo que se descubrió que la proteína ZP3 de la zona pelúcida es el sitio de unión complementario para la b-1-4 galactosiltransferasa del espermatozoide y que esta interacción media fuertemente la unión entre el espermatozoide y el ovocito Aunque la presencia de esta enzima en espermatozoide

humano fue demostrada por el grupo de Sullivan (1989), su verdadera presencia en la superficie del espermatozoide es algo controversial, se conoce que otros grupos no han sido capaces de detectarla (Tulsiani y col., 1990).

Una proteína, la tirosincinasa parece estar involucrada en la regulación de la reacción acrosomal en el ratón. En este contexto una proteína de 95 Kda. (P95), ha sido identificada en la superficie del espermatozoide y está asociada con la unión a la zona pelúcida, sirviendo como un ligando-receptor y posiblemente iniciando la subsecuente inducción de la reacción acrosomal (Saling, 1991; Leyton y col., 1992).

Existen dos hipótesis que tratan de explicar la función de estas proteínas, una es que la P95 es el mismo receptor de la proteína tirosincinasa ó que P95 sirve como receptor a ZP3 y es diferente a una proteincinasa que es activada durante una interacción gamética.

En el humano un receptor espermático de 95 Kda. fue identificado y se encontró también que este receptor media la reacción acrosomal por una interacción con la zp3 (Brucker y col., 1995).

Trabajos realizados con microscopía de luz apoyan la presencia de un receptor a progesterona en la membrana plasmática del espermatozoide humano (Blackmore y col., 1991; Tesarik y col., 1992). La acción de la progesterona en la superficie del espermatozoide humano, fue primero demostrada directamente por experimentos en los cuales una respuesta a calcio e iniciación de la reacción acrosomal fueron obtenidos, al poner en contacto progesterona conjugada con espermatozoides con membrana impermeable (Blacmore y col., 1991; Meizel y col., 1991; Tesarik y col., 1992).

La relación que existe entre el receptor de progesterona en el espermatozoide de humano con los canales de calcio es desconocida, pero existe una hipótesis al respecto y es que la progesterona induce la entrada de calcio hacia el espermatozoide, influyendo directamente sobre los receptores que operan los canales de calcio y que el receptor de progesterona en la superficie celular del espermatozoide podría controlar dichos canales. Comparando el uso de progesterona con el de proteína de la zona pelúcida, para la estimulación de la reacción acrosomal se observa una muy similar sino es que idéntico mecanismo de acción, estimulando el flujo de calcio (Brucker y col., 1995).

Un segundo sitio potencial de interacción entre la progesterona y el espermatozoide ha sido identificado como un receptor parecido al del ácido gama aminobutirico tipo A (GABA_A) / canal de cloro (Wistrom y col., 1993). Tres diferentes anestésicos metabolitos de

progesterona, se conoce activan y/o potencializan la actividad por GABA del complejo receptor GABA_A/ neuronal canal de cloro, siendo capaces de desencadenar la reacción acrosomal. La presencia extracelular de cloro parece ser un requisito indispensable para que la progesterona induzca la reacción acrosomal, lo que es opuesto a la reacción acrosomal inducida por ionóforo. Anticuerpos contra la subunidad alfa del receptor GABA_A del cerebro bovino, tiñen específicamente la membrana de la región del segmento ecuatorial del espermatozoide de humano. Dos bandas de masa molecular de 50 y 75 KDa fueron detectadas en extractos de espermatozoides de humano por el anticuerpo anti-GABA_A. Esto sugiere que la progesterona podría interactuar con dos tipos diferentes de receptores esteroidales en la membrana plasmática del espermatozoide, quizás el complejo receptor esteroideal / canal de calcio o el canal de calcio unido a el receptor a progesterona (Blackmore y col., 1991).

Se ha obtenido un anticuerpo monoclonal (mAB). AG7 dirigido contra el antígeno denominado SAA-1 que aparentemente tiene una masa molecular de 220 KDa, y que es un antígeno que se encuentra en el acrosoma del espermatozoide humano (Brucker y col., 1992^a). El AG7 es altamente específico contra el espermatozoide y no contra otras células y tejidos humanos. En experimentos *in vitro* con ratones, el mAB AG7 inhiben la fertilización en casi el 100% y en fertilización *in vivo* es casi igual inhibida después de la inmunización (Brucker y col., 1992b). La inhibición ocurre antes de que el espermatozoide se una a la zona pelúcida y después de que inicia su progresión hacia el sitio en la zona, lo que sugiere que la inhibición de la reacción acrosomal sea la causa. Esto se ha demostrado al observar que el mAB AG7 inhibe la continuación de la reacción acrosomal con progesterona en espermatozoides de humano que previamente se habían capacitado (Brucker y col., 1994). Además el AG7 fue capaz de suprimir completamente el influjo de calcio inducido por progesterona en espermatozoides de humano *in vitro* (Brucker y col., 1992a).

Otros estudios hechos en ratón indican que el antígeno M42 el cual tiene una masa molecular de 200/220 KDa inhibe la fertilización a nivel de la interacción entre el espermatozoide y la zona pelúcida (Saling y col., 1985). Mas tarde se demostró el M42 realiza una función en etapas tempranas de la reacción acrosomal inducida por homólogos de la zona pelúcida (Leiton y col., 1989). Se ha reportado una reacción

cruzada entre el M42 con el espermatozoide de hamster sin embargo no cruza con antígenos de espermatozoides de humano ni de conejo (Saling y col., 1985).

8.5.- MECANISMOS DE REGULACION INTRACELULAR.

Las uniones de progesterona con los receptores de superficie celular no han sido afectadas en la presencia de tripsina (Tesarik y col., 1993); Los inhibidores de tripsina redujeron el índice de reacción acrosomal inducido en espermatozoides con zona pelúcida, sin embargo no existen datos que demuestren la acción de estas sustancias sobre la concentración de calcio intracelular en espermatozoides humanos estimulados con zona pelúcida (Llanos y col., 1993).

La progesterona induce en el espermatozoide un flujo de calcio y posteriormente la reacción acrosomal y esto depende de la actividad producida por una enzima parecida a tripsina presente en el espermatozoide. Esto fue concluido de estudios en los que se uso el inhibidor sintético reversible a tripsina, hidrocloreuro de benzamida y 4'-acetamidofenil-4-guanidinobenzoato, un pseudo inhibidor de la enzima parecida a tripsina (Pillai y col., 1991). Estas sustancias inhiben el flujo de calcio y de reacción acrosomal en espermatozoides inducidos con progesterona, pero no inhiben esta función en espermatozoides estimulados con ionóforo de calcio. Además un activador asociado al ovocito pero presente en el espermatozoide, la acrosin proteasa, se ha demostrado que es capaz de potencializar la acción de la progesterona en el espermatozoide humano (Mendoza y col., 1993). Esto sugiere que la enzima parecida a la tripsina media los pasos de los eventos membranales necesarios para que la progesterona induzca un aumento intracelular de calcio.

En espermatozoides de golfito de mar se encuentra una proteasa parecida a la quimiotripsina que inhibe la reacción acrosomal inducida por el gel que rodea los ovocitos.

8.6.- FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS "G".

Las proteínas regularmente unidas a GTP (proteínas "G") por acoplación a receptores, están relacionadas con la acción de más del 80% de los neurotransmisores y hormonas conocidas, así como de la mayoría de factores parácrinos y autócrinos que regulan las interacciones celulares (Birnbaumer y col., 1990). La zona pelúcida induce reacción acrosomal en espermatozoides de ratón y de humano y esto parece estar regulado por

una cadena de eventos intracelulares, en los que se traduce una señal en respuesta de estímulos hormonales vía proteínas "G" (TesariK y col., 1993b; WArD y col., 1992). La presencia de proteínas "G" ha sido verificada en todos los espermatozoides estudiados en los que se incluyen también las proteínas "Gi" y "Gz" (Glassner y col., 1991; Kopf y col., 1986). Basados en su cadena funcional alfa, la acción de las proteínas "G" son diversas, y además la proteína "G" individualmente puede tener varias funciones efectoras, como la de inhibición de adenil ciclasa, estimulación de fosfolipasa C, estimulación y liberación de ácido araquidónico vía fosfolipasa A2 y activación de canales de calcio y potasio mediante la regulación de ligandos y receptores.

Una de las características típicas de las proteínas "G" es su alta sensibilidad a la toxina pertussis (PTX), la cual cataliza la ADP ribosilación de moléculas de proteína "G". La acción inhibitoria de PTX en Gi fue utilizada para investigar la relación entre Gi y la reacción acrosomal. En el ratón se demostró claramente que la ZP3 regula la señal de traducción, aunque con la proteína G asociada a la membrana y presumiblemente unida al receptor ZP3 en la membrana plasmática (Ward y col., 1992). Estas funciones fueron sensibles a tratamientos con PTX, pero la presencia de poblaciones de proteínas G insensibles a la toxina fue demostrada (Brucker y col., 1995).

Aunque la PTX inhibe la inducción de la reacción acrosomal desencadenada por la presencia de ZP en espermatozoides humanos, la progesterona induce también reacción acrosomal y no se ve influenciada por la PTX, ni afectó el flujo de calcio (Brucker y col., 1995).

Puede ser posible que dos diferentes proteínas G median la respuesta de los dos activadores, los que involucran proteínas Gi sensibles a PTX en la reacción acrosomal inducida por la zona pelúcida y las proteínas G insensibles a PTX en la reacción acrosomal inducida por progesterona, o bien es posible también que la progesterona induzca reacción acrosomal no involucrando a proteínas G.

8.7.- FUNCION DEL METABILISMO DEL FOSFOINOSITOL.

En espermatozoides humanos, la progesterona o líquido folicular estimulan rápidamente un cambio en los fosfolípidos de membrana como fosfatidilinositol 4,5-bifosfato y fosfatidilinositol 4 fosfato, en los polifosfoinositoles inositol 1,3,4,5-tetrakisfosfato e inositol 1,4,5 trifosfato (Thomas y col., 1989). La hidrólisis de los fosfoinositoles fue asociada con

un rápido influjo de calcio. Extensos estudios usando el ionóforo de calcio A-23187 para la inducción de la reacción acrosomal fueron conducidos en diferentes especies de mamíferos incluyendo al humano. Seguido de la entrada de calcio, se presentó un rompimiento de polifosfoinositoles espermáticos y generación consecuente de diacilglicerol (Dimino y col., 1989; Roldan y col., 1989, 1990). Estos rompimientos de fosfoinositoles se ha demostrado que son eventos mediados por fosfolipasa C y dependientes de calcio (Roldan y col., 1989). La presencia de cantidades considerables de fosfolipasa C específica para fosfoinositoles ha sido descrita en espermatozoides humanos (Ribbes y col., 1987). Bajos niveles de calcio (Micromolar) fueron necesarios para dañar los fosfoinositoles, en contraste niveles millimolar de calcio fueron necesarios para inducir reacción acrosomal tardía. En el sistema en el que se uso ionóforo el rompimiento de los fosfoinositoles y la generación de subsecuente de poliinositoles derivados del glicerol se demostró completarse en 5 minutos (Roldan y col., 1989,1990). Estos resultados sugieren una temprana función del metabolismo de fosfoinositoles en la iniciación de la reacción acrosomal.

La función de la producción de fosfatos de inositol durante la reacción acrosomal no ha sido esclarecida. Tipicamente el fosfato de inositol tiene la función de movilizar calcio de fuentes internas, semejantes a reticulo endoplásmico. Algunos estudios indican que el fosfato de inositol puede promover la entrada de calcio vía membrana plasma (Irvine y col., 1987). Por ejemplo los receptores a trifosfato de inositol presentes en la membrana plasmática de células T, pueden ser responsables de la entrada prolongada de calcio que inicia la respuesta proliferativa (Khan y col., 1992). Por lo tanto es posible que la entrada de millimolar de calcio en la reacción acrosomal tardía es facilitada por el fosfato de inositol (Brucker y col., 1995).

El segundo producto del rompimiento de fosfatidil, el diasilglicerol, el cual tiene una variedad de efectos en los procesos celulares. En varios tipos de células, el blanco de acción de los mensajeros de diasilglicerol es el calcio y fosfolípidos dependientes de la proteína cinasa C (Nishizuka, 1984).

La proteína cinasa C, es la enzima clave que regula el mecanismo de señalización de la traducción. La actividad de la proteína cinasa C es solo detectable en el espermatozoide humano (Rotem y col., 1990). La activación dependiente de calcio de la proteína cinasa C por diasilglicerol puede accionar un segundo mensajero intracelular durante la reacción

acrosomal. Al igual, un inhibidor de la proteína cinasa C, 1-5-isoquinolinilsulfonil-2-metilpiperazina, proveniente del DOG induce reacción. Resulta interesante que los agentes pueden causar únicamente la reacción acrosomal después de la capacitación y en medios que contienen calcio. Sin embargo cuando se utiliza el DOG que es un estimulador, la presencia de calcio no es necesaria para la reacción acrosomal. Posiblemente esto alivie la necesidad de agregar calcio a los medios para desencadenar la reacción acrosomal. Alternativamente el calcio puede liberarse de reservorios intracelulares, semejantes a la membrana perinuclear (Blackmore,1993; Meizel y col., 1993). Contrariamente al reporte anterior en el humano, estudios usando espermatozoides de carnero en un sistema en el que se usó ionóforo de calcio se demuestra que el diasilglicerol no se vio involucrado en la activación de la proteína cinasa C (Harrison y col., 1990; Roldan y col., 1992), y la actividad de la proteína cinasa C no fué detectada en espermatozoides de carnero (Roldan y col., 1988).

Otra función de segundos mensajeros de diasilglicerol es la activación de fosfolipasa A2 (PLA), generada del ácido araquidónico y lisofosfolípidos proceso que depende de calcio. Diferentes DAGs, semejantes a 1,2-dioleoil-sn-glicerol y 1-2-acetil-sn glicerol, se encontró aumenta grandemente la actividad de la PLA2 en espermatozoides de carnero (Roldan y col., 1991). Hace algunos años se demostró que la activación de PLA2 después de la entrada de calcio efectivamente conduce a la exocitosis del acrosoma del espermatozoide. La PLA2 parece conducir daño en la fosfatidilcolina, fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina liberando ácido araquidónico. Resulta interesante que la concentración del ácido araquidónico comienza a aumentar a los 5 minutos después de la estimulación celular y continua aumentando significativamente durante los 20 minutos siguientes (Roldan y col., 1993). La actividad de la PLA2 ha sido caracterizada solo en espermatozoides humanos y está ampliamente asociada a la membrana (Fry y col., 1992; Thakkar y col., 1984). Evidencias preliminares que relacionan la actividad de la PLA2 con la exocitosis acrosomal en espermatozoides humanos ha sido presentada (Bennet y col., 1987). Algunos de los lisofosfolípidos creados por PLA2 pueden tener una importante función en la fusión membranal, Se conoce que la PLA2 induce fusión de vesículas de fosfatidilserina bajo condiciones experimentales en presencia de calcio millimolar (Fry y col., 1992). Sin embargo la influencia de la PLA2 en la reacción acrosomal es controversial, Algunos otros autores han encontrado que la PLA2 no está involucrada en

la reacción acrosomal (Anderrson y col., 1990). Aunque la actividad de la PLA2 está presente en el espermatozoide humano, inhibidores de la PLA2 no interfieren con el proceso de reacción acrosomal.

Proteínas de la zona y/o progesterona unidas a sus respectivos ligandos en la membrana del espermatozoide inducen un aumento inicial e intracelular de calcio. Posiblemente, la región ZP3 de la zona pelúcida está operando vía voltage-puerta canales de calcio. Sin embargo la progesterona puede activar canales de calcio operados por receptores como el receptor a GABAa-canal de cloro. Al menos en el caso de la ZP3, parece haber una temprana activación de la proteína Gi con la subsecuente estimulación de fosfolipasa C, la cual media el rompimiento de los polifosfoinocitoles situados en la membrana plasmática del espermatozoide. La relación de la progesterona proteínas Gi no es segura, pero estas proteínas con la ZP3 estimulan el rompimiento de los polifosfoinocitoles. El resultado del rompimiento de los fosfoinocitoles, es la producción de diacilglicerol e IP3, con IP3 hay un flujo de calcio acelerado. Subsecuentemente el diacilglicerol puede activar a la proteína cinasa C y/o PLA2, o alternativamente, la proteína cinasa C es activada por diacilglicerol, la cual en turno activa PLA2, resultando la creación de lisofosfolípidos por Pla2. El conjunto de lisofosfolípidos con la elevación intracelular de calcio perturba las membranas acrosomales principiando la fusión y la exocitosis acrosomal o la formación de canales.

Los datos obtenidos del humano y otras especies de mamíferos, sugieren que la inducción de la reacción acrosomal es regulada por diferentes receptores moleculares y proteínas reguladoras. Aunque se han encontrado diferentes receptores y varios elementos intracelulares que pueden estar participando en la reacción acrosomal, los datos hasta el momento, no son los suficientes para dilucidar la secuencia de regulación de la reacción acrosomal.

9.- CITOMETRÍA DE FLUJO.

Métodos para la valoración de la calidad de los espermatozoides antes de la inseminación o después de algún tratamiento experimental en el laboratorio, se siguen realizando en un intento de estimar con mayor precisión la capacidad fertilizante de estos. Desafortunadamente los experimentos realizados en los laboratorios, no predicen con precisión su capacidad fecundante y con frecuencia los experimentos que se realizan no son repetibles (Graham y col., 1980).

Como se sabe el espermatozoide consta de diferentes membranas: membrana plasmática, membrana acrosomal externa y membrana acrosomal interna, así como de la membrana de las mitocondrias, para que el pueda competir en el proceso de fertilización, es necesario que sus membranas estén integras antes de la capacitación.

El estudio individual de los componentes estructurales de los espermatozoides, no predicen efectivamente su capacidad fertilizante (Graham y col., 1980). Sin embargo la combinación de diferentes técnicas pueden predecir satisfactoriamente la fertilidad del semen como son: el diferenciar las células vivas de las muertas y la valoración de la integridad acrosomal. Pero para desarrollar estas técnicas se requiere de tiempo para su preparación y valoración, además el número de células que se analizan para su evaluación no es mayor de 200 en la mayoría de las veces. Una técnica que nos permite analizar con precisión miles de células en cuestión de segundos y sin la extensiva preparación necesaria para teñir los espermatozoides, es la citometría de flujo.

La citometría de flujo (CMF) es una técnica que permite obtener datos multiparamétricos sobre las características físicas y químicas de células en suspensión.

El citómetro de flujo es capaz de medir las propiedades ópticas de las células, mediante la tinción con fluorocromos que se unen específicamente a un constituyente celular. Las células son inyectadas en un flujo líquido laminar y pasan una a una por un punto de medida iluminado con luz de alta intensidad (láser) a 488 nm. Cada célula en el punto de interacción produce una señal fluorescente que es de intensidad proporcional a su contenido en fluorocromo. Uno o varios detectores recogen la fluorescencia emitida y transforman la señal a pulsos eléctricos. También se recoge la luz dispersada por la célula, que esta en función del tamaño, forma y estructura de la misma.

A diferencia de otras técnicas, el citómetro de flujo mide características celulares individuales de un gran número de células (5 a 10,000 células por segundo), y además permite medir características de poblaciones en muestras heterogéneas.

CARACTERÍSTICAS CELULARES MEDIBLES POR CITOMETRÍA DE FLUJO.

| ESTRUCTURALES | FUNCIONALES |
|------------------------------|---|
| Tamaño y forma celular | |
| Granularidad | Estado de Red-Ox |
| Proteínas | |
| Contenido de DNA, RNA. | Estudios de membrana |
| Estructura cromatínica | Actividad enzimática |
| Proteínas totales o básicas | Endocitosis |
| Grupos químicos | Síntesis de ADN |
| Antígenos | Receptores |
| Azúcares de superficie | Potencial de membrana |
| Estructura del citoesqueleto | PH, Ca ²⁺ , Carga superficie |

Los fluorocromos ofrecen un método sensible para obtener información acerca de la estructura, función y vitalidad de las células.

Algunos de los fluorocromos utilizados en la citometria de flujo están unidos a anticuerpos, como pueden ser proteínas, como por ejemplo la anexina V, una proteína de membrana de 320 aminoácidos y un peso específico de 35-36, esta proteína tiene una actividad anticoagulante y se encuentra normalmente en la cara citosólica de la membrana plasmática. La Anexina V, en presencia de concentraciones fisiológicas de Ca²⁺, tiene afinidad por los fosfolípidos (Grundmann y col.,1988) y en concentraciones definidas de sales y Ca²⁺, tiene una mayor afinidad por la fosfatidilserina, que por otros fosfolípidos (Andree y col., 1990; Vermes y col 1995).

La Anexina V, conjugada con Isotiocianato de Fluoresceína (FITC), es utilizada en Citometría de Flujo para medir cambios en la distribución de los fosfolípidos en la membrana plasmática, o bien, la pérdida de la asimetría de la membrana celular. Normalmente la fosfatidilserina, se encuentra solo en la cara interna de la membrana y solo cuando se pierde la asimetría de la membrana, puede ser detectada en la cara externa (Fadok y col., 1992).

El citómetro de flujo puede medir simultáneamente 5 parámetros para cada célula: dispersión de la luz hacia el frente (FSC), dispersión lateral de la luz (SSC) y 3 regiones espectrales de emisión de fluorescencia (FL 1-3). El número de células que se pueden

analizar por esta técnica son de 500 a 10,000 células por segundo (Watson y Erba, 1994). Por cada evento que pasa a través del láser, el citómetro de flujo emite un valor relativo a FSC, SSC y FL, tomando en cuenta la cantidad y dirección de la dispersión de la luz incidente y la emisión de fluorescencia (Haynes, 1988).

APLICACIONES:

La CMF se puede emplear para estudiar características estructurales y funcionales de células o partículas en suspensión. La CMF se ha utilizado en biomedicina con diferentes objetivos:

•En hematología: conteo celular, fórmula leucocitaria, conteo reticulocitario, análisis de médula ósea. •En farmacología: estudios de cinética celular. •En inmunología: subpoblaciones T, tipo tisular, estimulación linfocitaria. •En oncología: diagnóstico/pronóstico, monitorizar tratamiento. •En microbiología: diagnóstico bacteriano y vírico, sensibilidad a antibióticos. •En genética: cariotipo, diagnóstico de portador, diagnóstico prenatal.

La citometría de flujo se ha utilizado también para estudiar las características del núcleo de los espermatozoides, como es la condensación de la cromatina; las características de la cromatina con relación a la fertilidad de espermatozoides (Clausen y col., 1982; Dobrinski y col., 1994).

También la identificación y separación de espermatozoides X y Y (Garner y col., 1983); análisis morfológico, viabilidad e integridad acrosomal y la actividad mitocondrial de espermatozoides (Graham y col., 1990). Otras investigaciones en las que se han aplicado las propiedades que ofrece la citometría de flujo en el estudio de espermatozoides, es en la anticoncepción, en el que espermatozoides de ratón son puestos en contacto con anticuerpos contra espermatozoides A-1, los cuales inhiben la penetración de los espermatozoides hacia la zona pelúcida del ovocito y que por medio de la CMF puede ser medida la unión de dicho anticuerpo a los espermatozoides y con esto determinar su eficiencia (Kawai y col., 1994).

II.- JUSTIFICACIÓN

En los mamíferos, incluyendo al humano, los espermatozoides presentan una serie de cambios antes de que ellos adquieran su capacidad fecundante. Estos cambios se conocen como capacitación y reacción acrosomal. La capacitación se presenta después de la eyaculación y ocurre fisiológicamente en el tracto reproductor femenino. La capacitación se puede definir, como una serie de cambios bioquímicos en la membrana plasmática que preparan al espermatozoide para la reacción acrosomal (Austin, 1967; Yanagimachi, 1994). Durante este proceso se presenta una remoción o alteración gradual de glicoproteínas periféricas, una redistribución de glicoproteínas integrales, la reducción de colesterol en la membrana, y cambios en la distribución y composición de fosfolípidos (Yanagimachi, 1988). En condiciones *In vivo*, la capacitación es necesaria para que el espermatozoide pueda pasar a través de las células del cumulus que rodean al ovocito.

El calcio extracelular es requerido para completar la capacitación y es necesario también para que se presente la reacción acrosomal. En el espermatozoide la concentración de calcio intracelular, aumenta durante la capacitación (Fraser y col., 1992). Una acción directa del calcio sobre la membrana es permitir la fusión entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa y propiciar así la reacción acrosomal. La reacción acrosomal representa un absoluto requerimiento para completar exitosamente la fertilización. Únicamente los espermatozoides reaccionados en el momento idóneo son capaces de pasar a través de la zona pelúcida y subsecuentemente fusionarse con la membrana plasmática del ovocito (Cherr y col., 1986; Cummins y col., 1986).

Debido a que no se conocen del todo los cambios membranales del espermatozoide durante la capacitación, ni la manera en que se lleva a cabo la formación de vesículas entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa durante la reacción acrosomal. El propósito del presente trabajo es conocer si el movimiento de "flip - flop" está presente en la membrana del espermatozoide durante los cambios membranales que se presentan durante la capacitación y la reacción acrosomal y si es necesaria la pérdida de la asimetría de la membrana plasmática para que se presente la fusión entre membranas.

III.- OBJETIVO GENERAL.

DEMOSTRAR LA PRESENCIA DE MOVIMIENTO DE "FLIP-FLOP" EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA DEL ESPERMATOZOIDE DE CONEJO, DURANTE LA CAPACITACIÓN Y REACCIÓN ACROSOMAL POR FIJACION DE ANEXINA V-FICT A FOSFATIDILSERINA.

IV.- OBJETIVOS PARTICULARES.

CONOCER POR CITOMETRÍA DE FLUJO LOS CAMBIOS EN LA FLUORESCENCIA POR LA UNIÓN DE ANEXINA V-FICT A FOSFATIDILSERINA, QUE PRESENTAN LOS ESPERMATOZOIDES OBTENIDOS DE EPÍDÍMIMO Y DE EYACULADO, DURANTE EL PROCESO DE CAPACITACIÓN Y REACCIÓN ACROSOMAL

ESTUDIAR EL EFECTO DEL Ca^{2+} ASÍ COMO DEL IONÓFORO DE Ca^{2+} A-23187 SOBRE EL MECANISMO DE "FLIP-FLOP", EN ESPERMATOZOIDES DE EYACULADO Y EPIDÍMIMO DURANTE LA CAPACITACIÓN Y REACCIÓN ACROSOMAL.

V.- HIPÓTESIS.

DURANTE LA CAPACITACIÓN Y LA REACCIÓN ACROSOMAL SE PRESENTAN CAMBIOS, EN LA DISTRIBUCION DE FOSFATIDILSERINA DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA DEL ESPERMATOZOIDE POR EL MECANISMO DE "FLIP-FLOP".

VI.- MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 10 conejos machos Nueva Zelanda Blanco, sexualmente maduros, con fertilidad probada. La edad de los animales fue entre 12 y 24 meses con un peso corporal promedio de 3.5 Kg. Los animales permanecieron en el bioterio del Hospital de Especialidades del Centro Médico S XXI, IMSS, disponiendo de alimento y agua **ad libitum**, temperatura controlada de 18°C y ciclos de luz oscuridad de 12 x 12 horas.

Obtención de las muestras de espermatozoides.

A) EYACULADOS (ESQUEMA NO.1).

El eyaculado se obtuvo con ayuda de una vagina artificial de plástico, con funda de látex, con temperatura de 45°C como ha sido sugerido por otros autores (Bredderman y col., 1967). Las muestras de cada animal se colectaron dos veces por semana (ver esquema No. 1).

B) DE EPIDÍDIMO (ESQUEMA NO. 2).

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical y se desangraron cortando la yugular, después los testículos se disecaron, se ligaron las venas y conducto del epidídimo con hilo de algodón y se perfundió el paquete vascular con 5 ml Solución Salina Fisiológica NaCl 0.9 M, pH 7.4 a 37°C, con el propósito de evitar la contaminación de las muestras con sangre, posteriormente se separó el epidídimo del testículo, se ligó con hilo quirúrgico entre las regiones de la cauda y la pieza media del epidídimo, se cortó con tijera y se eliminó el tejido adiposo. Cuando se tuvo esta región separada del resto del epidídimo, se inyectó por uno de los extremos con 5 ml de medio Brackett sin Ca^{2+} (NaCl 0.112 mM, K Cl 4.020 mM, NaH_2PO_4 0.830 mM, MgCl_2 0.520 mM, NaHCO_3 37. MM, Glucosa 13.9 mM, Piruvato de sodio 1.25 mM, albumina bovina cristalina), pH 7.8 (Brackett y Oliphant, 1979), los espermatozoides se obtuvieron haciendo pequeños cortes sobre la pared del órgano y se colectados en tubos cónicos de plástico de 10 ml.

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.

Se eliminaron las muestras que mostraron contaminación por orina, sangre o sedimentos, así como las que no tuvieron la viabilidad y movilidad apropiadas de acuerdo a las sugerencias de Belsey y col (1980), de manera que solo se usaron las muestras con movimientos progresivos calificados como buenos y excelentes.

La viabilidad de los espermatozoides, se evaluó por la técnica de tinción supravital con Eosina- Nigrosina (Swanson y col., 1951), con la cual los espermatozoides muertos adquieren la coloración roja mientras que los vivos, no se tiñen. En este estudio solo se consideraron las muestras con viabilidad superior al 80 %.

Las muestras de eyaculado, se purificaron en un gradiente de Percoll discontinuo, se modificó en nuestro laboratorio el método reportado por Suárez y col, (1986), con respecto al medio diluyente y la concentración de Percoll de la fase superior. El método consistió en lo siguiente: los eyaculados, se llevaron a un volumen de 1.5 ml con medio Brackett y se centrifugaron a 900 x g durante 20 minutos a temperatura ambiente, en un gradiente de Percoll discontinuo con el propósito de eliminar el plasma seminal, espermatozoides muertos y otros componentes de las muestras. El gradiente estaba formado por una fase inferior de 1.5 ml de Percoll al 95% en hepes 10 mM y NaCl 154 mM pH 7.4 y 2 ml de una fase superior de Percoll al 75% en medio Brackett sin albúmina y sin glucosa. Después de centrifugar la fase inferior, se diluyó con 5 ml de medio Brackett sin Ca^{2+} y se centrifugó a 500 x g por 5 minutos, esto con el fin de lavar los espermatozoides (para eliminar los restos de Percoll) posteriormente el precipitado se diluyó en 3 ml de medio Brackett sin Ca^{2+} y se tomó una alícuota para calcular la concentración de espermatozoides, la cual se diluyó 1:200 con citrato de sodio 2.5% y de formaldehído 1% en agua destilada, utilizando para este propósito una pipeta para glóbulos blancos, la muestra se agitó por 3 minutos, se eliminaron las 5 primeras gotas de la pipeta y después se depositó la muestra en una cámara de Neubauer. Se contaron los espermatozoides que se encontraban en los cuadrantes de las esquinas y del centro, del cuadrante con cuadrícula pequeña (igual que como se cuentan los glóbulos blancos), la concentración espermática se calculó de la siguiente forma: el número total de espermatozoides contados se multiplicó por 10^6 y esto da la cantidad de espermatozoides que se tienen en 1 ml.

El siguiente tratamiento se realizó tanto para las muestras de epidídimo como de eyaculado y consistió en diluir las muestras en un volumen suficiente de medio Brackett

sin Ca^{2+} . para tener una concentración de 15×10^6 espermatozoides por ml. Se dividieron las muestras en dos alícuotas, se centrifugaron a $500 \times g$ durante 5 minutos. Uno de los precipitados se resuspendió en medio Brackett con Ca^{2+} y el otro en medio Brackett sin Ca^{2+} . Se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO_2 al 5%. Se tomaron alícuotas de 20 μl , cada 2 horas para analizarlas por citometría de flujo como se indica mas adelante.

Después del tiempo de capacitación a una, alícuota de 300 μl se le adicionó el ionóforo de calcio A-23187 10 μM final (con 0.1% de concentración final de dimetilsulfoxido), a otra alícuota igual únicamente se le adicionó diluyente (control) y se continuó la incubación por 3 horas. Al final del tiempo de incubación se tomaron alícuotas de 20 μl de cada tratamiento y se analizaron por citometría de flujo como se indica a continuación

ESTUDIO CITOMÉTRICO (ESQUEMA NO. 3).

Se analizaron por citometría de flujo un total de 10 experimentos, 5 con muestras de espermatozoides obtenidos de eyaculados y 5 con muestras obtenidas de cola de epidídimo.

Para el estudio citométrico, se utilizó un "kit" con Anexina V, una proteína con actividad anticoagulante, que se encuentra normalmente en la cara citosólica de la membrana plasmática. La Anexina V, en presencia de concentraciones fisiológicas de Ca^{2+} , tiene afinidad por los fosfolípidos (Grundmann y col.,1988) y en concentraciones definidas de sales y Ca^{2+} , tiene una mayor afinidad por la fosfatidilserina, que por otros fosfolípidos (Andree y col., 1990; Vermes y col 1995).

La Anexina V, conjugada con Isotiocianato de Fluoresceína (FITC), es utilizada en Citometría de Flujo para medir cambios en la distribución de los fosfolípidos en la membrana plasmática, o bien, la pérdida de la asimetría de la membrana celular. Normalmente la fosfatidilserina, se encuentra solo en la cara interna de la membrana y sólo cuando se pierde la asimetría de la membrana, puede ser detectada en la cara externa (Fadok y col., 1992).

Para este estudio, se utilizó un estuche con Annexin-V Fluos, un conjugado fluorescente comercial (Boehringer Mannheim No. de catálogo 1828681).

Las muestras se procesaron para el estudio citométrico de la siguiente manera:

De cada fracción, se tomaron 2 alícuotas de 20 μ l de cada una (3×10^5 células), a la primera alícuota no se le adicionó Anexina-V-Fluos, y a la fracción 2 se le adicionó 10 μ l de la solución de Anexina (10 μ g / ml). Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos en oscuridad, después de este tiempo, el volumen se llevó hasta 500 ml con buffer hepes (NaOH 10 mM, NaCl 140 mM y CaCl₂ 5 mM, pH 7.4). Las muestras se analizaron con el programa Lysys II, de Becton Dickinson en un citómetro de Flujo FACsort, (Becton Dickinson, San José CA), equipado con lámpara de láser, emitiendo luz de excitación a 488nm. El Isotiocianato de Fluoresceina (FITC), emite una señal que puede ser leída como fluorescencia 1 (FL)

Antes de cada experimento, se verificó la calibración del Instrumento, así como la correcta función de doble discriminación, para lo cual se usaron las esferas de calibración Calibrate QC que Becton tiene para este fin.

Se analizaron 10,000 células por cada muestra. La fluorescencia, fue graficada en forma logarítmica, y el ángulo de dispersión de la luz hacia el frente, fue adquirido en E-1 con un umbral de 36. Con la alícuota sin fluorocromo, se ajustó la fluorescencia negativa, de tal manera que el 98% de los eventos fueran registrados con valores de fluorescencia no mayores de 10^1 .

Se tomó una muestra de los espermatozoides con y sin Ca²⁺ y sin incubar (tiempo cero) con Anexina y se tomó como referencia para medir el incremento en FL que se detectó después de cada tiempo de incubación. Este procedimiento, se siguió en cada una de los tratamientos del experimento. Después de tres horas mas de incubación, las muestras se analizaron en el citómetro.

Las lecturas del citómetro de flujo para experimentos en los que se usa un solo fluorocromo como es este caso, se reportan como histograma, en el eje de las "Y" se gráfica un valor que se relaciona con el número de células y en el eje de las X, se gráfica el valor de FL que se presenta en forma logarítmica. En los histogramas de nuestros resultados aparece una imagen con dos acumulaciones de células; una, con valor de FL, menor o igual a 10^1 , que representa a las células con Fluorescencia negativa o fluorescencia intrínseca (R1), y otra acumulación celular con valor de FL mayor a 10^1 , la cual representa las células con FL positiva (R2), en éstas últimas se presento la unión de Anexina-FICT a moléculas de fosfatidilserina expuestas en la cara externa de la membrana de los espermatozoides. Con el mismo programa del citómetro se calcularon

los porcentajes de espermatozoides con fluorescencia negativa y positiva. Nuestros resultados se presentan como el porcentaje de células con FL positiva, y su variación con respecto a las condiciones y el tiempo de incubación.

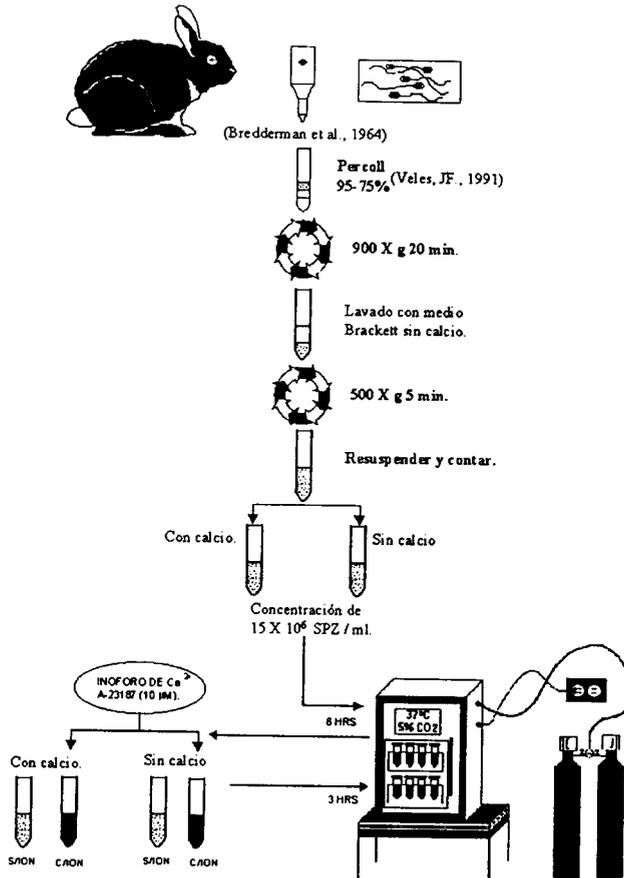
Todas las muestras de espermatozoides, que se trataron con ionóforo A-23187, se tiñeron con Azul de Coomassie con el propósito de verificar si la reacción acrosomal se había llevado a cabo.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.

Los resultados fueron analizados utilizando una prueba paramétrica de Análisis de Varianza de 2 vías (ANOVA) si este análisis presento diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entonces se usó la prueba de Tukey para hacer la comparación entre grupos. El análisis estadístico se realizo utilizando el programa para computadora Sigma stat 2.0 del paquete Jadel Scientific.

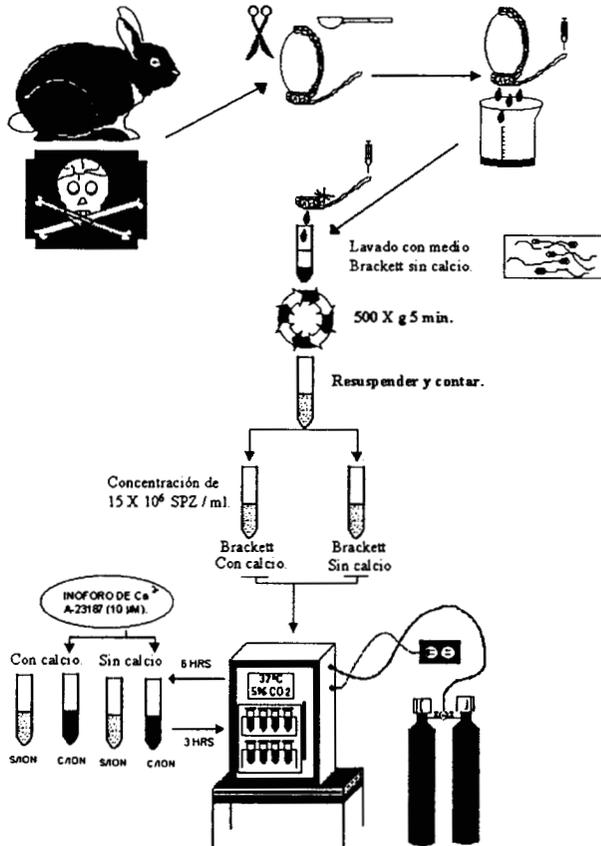
ESQUEMA No.1

OBTENCION DE ESPERMATOZOIDES DE EYACULADO



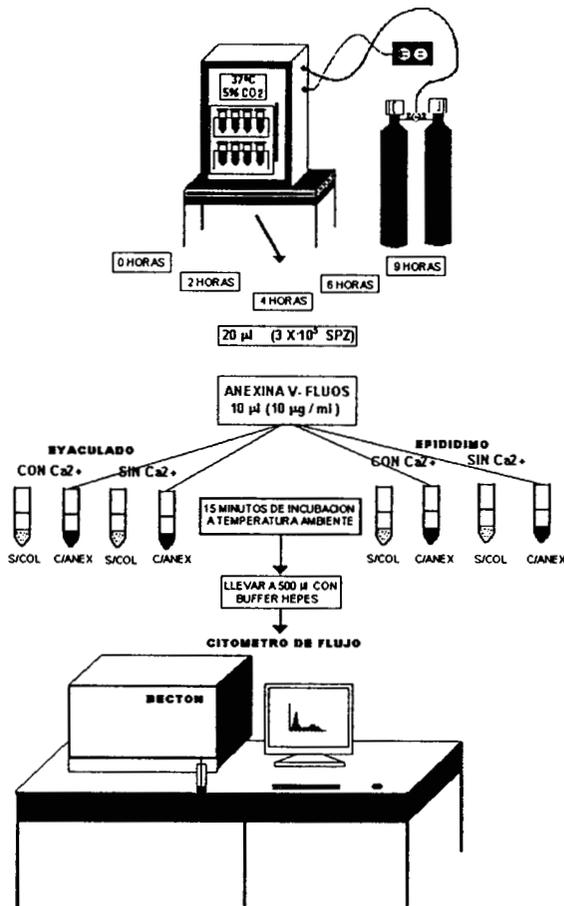
En este esquema se describe de manera general la metodología de este trabajo, desde la obtención de la muestra hasta la realización de las diferentes alícuotas así como la incubación de las mismas.

ESQUEMA No. 2
OBTENCION DE ESPERMATOZOIDES DE COLA DE EPIDÍDIMO



Este esquema muestra la forma de obtención de los espermatozoides de la cola del epidídimo así también se observa como se prepararon de las alícuotas y su incubación en el medio capacitante.

**ESQUEMA No.3.
ESTUDIO CITOMÉRICO.**

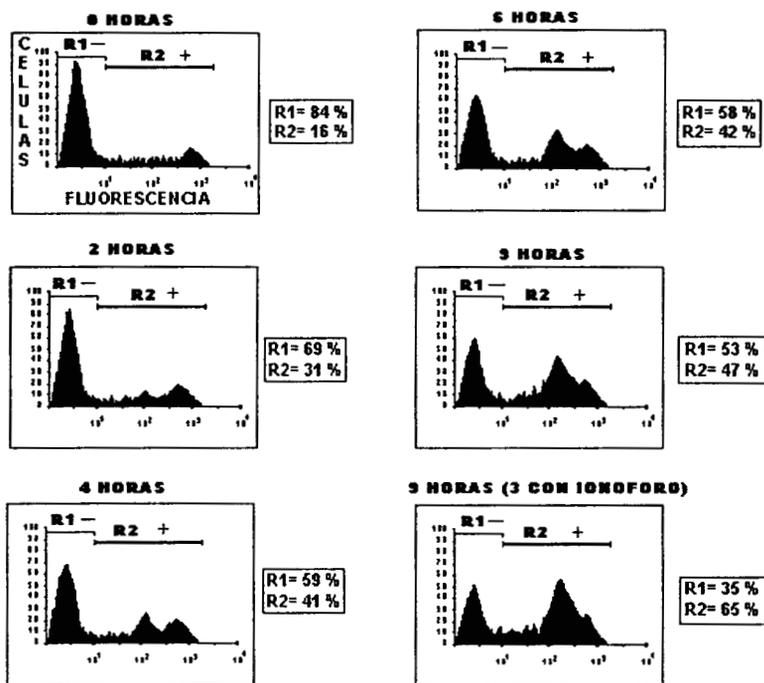


En este esquema se describe la preparación y tiempos de las muestras para ser leídas en el citómetro de flujo.

VII.- RESULTADOS.

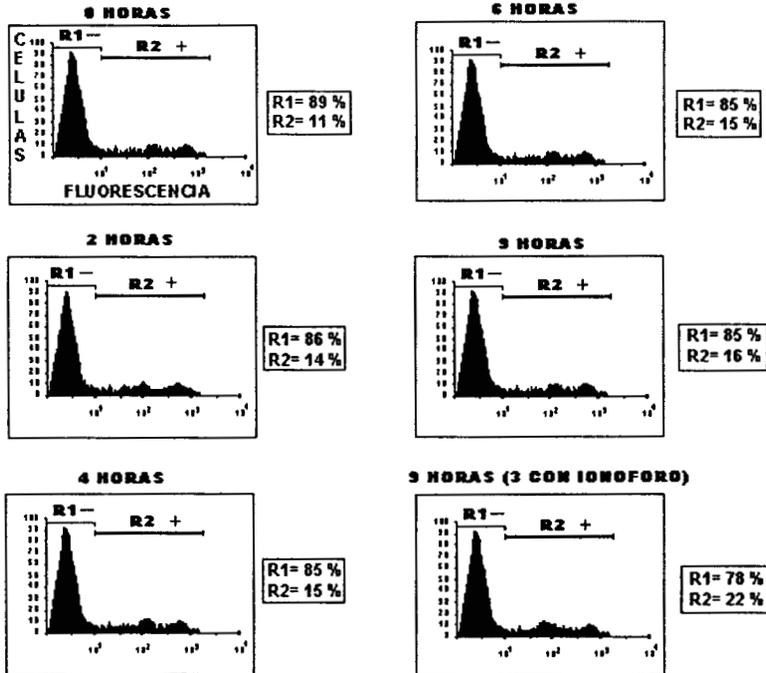
Los resultados que se presentan en todas las gráficas son los promedios y desviaciones estándar de 5 experimentos y representan el porcentaje de espermatozoides que presentaron fluorescencia positiva (R2), como se ejemplifica en el siguiente grupo de figuras:

ESPERMATOZOIDES DE EPIDÍDIMO INCUBADOS EN MEDIO BRACKETT CON Ca^{2+} .



En estas figuras se puede notar para todos los tiempos de incubación dos acumulaciones importantes de células: del lado izquierdo a la que denominamos R1 que corresponde aquellas células con fluorescencia negativa y la del lado derecho (R2) con fluorescencia positiva. En este grupo de gráficas podemos ver los cambios en la fluorescencia de una muestra de espermatozoides de epidídimo incubada en medio Brackett con Ca^{2+} a través del tiempo de incubación y la presencia de ionóforo.

ESPERMATOZOIDES DE EPIDÍDIMO INCUBADOS EN MEDIO BRACKETT SIN Ca^{2+} .



En este grupo de gráficas podemos ver que no se dan cambios de manera importante en la fluorescencia de espermatozoides de epidídimo incubada en medio Brackett sin suplemento de Ca^{2+} a través del tiempo de incubación ni con la presencia de ionóforo.

Los resultados cuando los espermatozoides fueron obtenidos de la cola del epidídimo e incubamos en medio Brackett sin suplemento de calcio fueron; para el tiempo cero de 18.39 ± 9.48 , a las 2 horas de incubación de 12.38 ± 4.27 ; a las 4 horas de 14.89 ± 6.51 y a las 6 horas de 16.43 ± 8.17 . El porcentaje de Fluorescencia, no mostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), para ninguno de los tiempos. Después del tiempo de capacitación (6 horas de incubación), la muestra que se incubó 3 horas más en presencia del ionóforo de calcio A 23187 (0.01 mM), mostró el 28.12 ± 4.59 de fluorescencia positiva. Cuando la muestra se incubó sin ionóforo el porcentaje de fluorescencia positiva fue de 17.7 ± 8.2 . En estos valores, se encontraron diferencias significativas en favor de la muestra con ionóforo ($p < 0.05$) (Gráfica 1).

Cuando se analizaron las muestras obtenidas de cola de epidídimo incubadas en presencia de medio Brackett completo (con suplemento de calcio) los resultados fueron en el tiempo cero 24.61 ± 8.57 , a las 2 horas de incubación 23.66 ± 5.39 , a las 4 horas 35.19 ± 14.91 ; a las 6 horas 38.24 ± 13.04 , estos porcentajes en términos generales muestran un aumento progresivo, estadísticamente significativo ($p < 0.05$) con respecto al tiempo. Cuando las muestras se incubaron 3 horas más en presencia de ionóforo, la fluorescencia 1 positiva fue muy superior a la de los espermatozoides incubados sin ionóforo (70 ± 7.5 vs 41.7 ± 14), dando diferencias estadísticamente significativas con un valor de $p < 0.001$ (**Gráfica 2**). En la **gráfica 3**, se muestra la comparación entre los resultados de los análisis de las muestras obtenidas de epidídimo, en ausencia y presencia de Ca^{2+} .

Los experimentos realizados con muestras de espermatozoides eyaculados fueron sometidas a los mismos tratamientos que los de cola de epidídimo, esto con el fin de detectar cambios debidos al origen de las muestras. Para las muestras incubadas en medio Brackett sin suplemento de Ca^{2+} , los resultados obtenidos fueron: tiempo cero 16.6 ± 7.5 ; 2 horas 23.06 ± 11.4 ; 4 horas 29.6 ± 10.15 ; a las 6 horas 38.8 ± 9.9 ; a las 9 horas 37 ± 11.24 y la muestra con ionóforo fue de 40.02 ± 13.85 .

Durante las primeras 4 horas de capacitación el porcentaje presenta una tendencia a incrementar, sin embargo con diferencias no significativas. Al comparar las primeras 4 horas con los tiempos siguientes (6 y 9 horas), si hubo diferencias estadísticamente significativa ($p < 0.05$). En presencia y ausencia de ionóforo, las muestras sin Ca^{2+} a las 9 horas de incubación no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). (ver **gráfica 4**).

Los espermatozoides de eyaculado incubados en medio Brackett con suplemento de calcio, presentaron siempre con un mayor porcentaje de fluorescencia 1 positiva, en comparación con los incubados en ausencia de Ca^{2+} (Gráfica 6). Los resultados con respecto al porcentaje de fluorescencia positiva en relación con el tiempo de incubación en Brackett con Ca^{2+} , fueron los siguientes: para el tiempo cero, 23.1 ± 4.49 ; para 2 horas de incubación 40.9 ± 23.9 ; para 4 horas 41.1 ± 17.8 ; para las 6 horas 42.6 ± 19.2 ; para las 9 horas 60.2 ± 8.47 y para la muestra con ionóforo de 75.9 ± 7.8 , es importante mencionar que hubo diferencias significativas entre los resultados obtenidos del primer tiempo de incubación con respecto a todos los demás tiempos, también encontramos diferencias al

comparar los resultados de las muestras que se incubaron con ionóforo con respecto a las demás muestras (ver gráfica 5).

En la **gráfica 6**, se muestra la comparación entre los resultados de los análisis de las muestras obtenidas de eyaculado, en ausencia y en presencia de Ca^{2+} .

Cuando se compararon los resultados de los experimentos de los espermatozoides de cola de epidídimo, con los obtenidos en el eyaculado, se pudo observar que en incubación en ausencia de Ca^{2+} , no hubo diferencias significativas ($p < 0.05$), para ninguno de los tiempos de incubación, a excepción de las 6 y 9 horas, en donde el porcentaje de espermatozoides fluorescentes fue significativamente mayor ($p < 0.05$ en los eyaculados para los dos tiempos (gráfica 7).

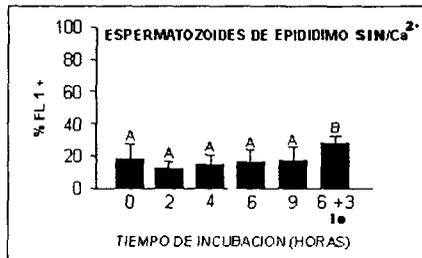
Al comparar el porcentaje de espermatozoides fluorescentes del eyaculado y del epidídimo en presencia de Ca^{2+} , no encontramos diferencias significativas ($p < 0.05$) en ninguno de los tiempos de incubación ni en presencia de ionóforo (ver gráfica 8).

Los porcentajes de reacción acrosomal obtenidos por tinción azul de Coomassie fueron: para las muestras de epidídimo incubadas en medio sin Ca^{++} durante 9 horas 12.8 ± 2.3 ; sin Ca^{2+} más ionóforo 15.4 ± 2.7 ; con Ca^{2+} sin ionóforo 25.8 ± 3 y para las incubadas con Ca^{2+} y en presencia de ionóforo 53.2 ± 11.4 . La mayoría de estos resultados presentaron diferencias significativas ($p < 0.001$), a excepción de las muestras incubadas sin Ca^{2+} en relación con las sin Ca^{2+} mas ionóforo (ver gráfica 9).

Los porcentajes de reacción acrosomal obtenidos por tinción de las muestras de eyaculado fueron: para las que se incubaron en medio sin calcio 12.6 ± 3 ; sin Ca^{2+} mas ionóforo 21.0 ± 5.7 ; las que se incubaron con suplemento de Ca^{2+} 33.4 ± 10.5 y con Ca^{2+} mas ionóforo $68.4 \pm 07.3\%$ La mayoría de estos resultados presentaron diferencias significativas ($p < 0.001$), a excepción de las muestras incubadas con Ca^{2+} en relación con las sin Ca^{2+} mas ionóforo. (ver gráfica 10). Al hacer una comparación entre el porcentaje de reacción acrosomal obtenido de las diferentes muestras tanto de eyaculado como de cola de epidídimo no se encontraron diferencias estadísticas significativas (ver gráfica 11).

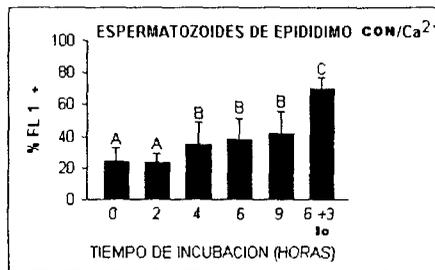
En las **gráficas 12 y 13** se hacen comparaciones entre la técnicas de tinción con azul de Coomassie para detectar reacción acrosomal y la de citometría en espermatozoides obtenidos de eyaculado y epidídimo se observa en general diferencias significativas ($p < 0.01$) entre ambas técnicas, obteniéndose porcentajes mayores con la técnica de citometría

Gráfica No. 1



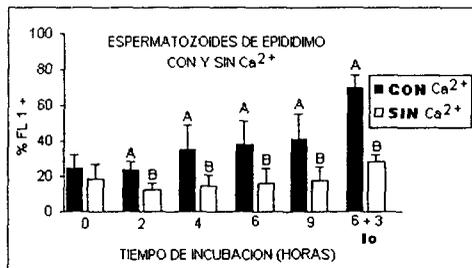
Porcentaje de espermatozoides de cola de epidídimo con fluorescencia positiva (unión de anexina V) a diferentes tiempos de incubación en medio Brackett sin Ca²⁺. Solo hubo diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) entre las barras de letra diferente.

Gráfica No. 2.



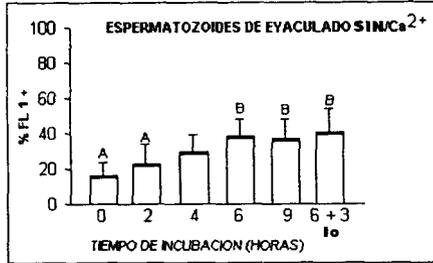
Porcentaje de espermatozoides de cola de epidídimo con fluorescencia positiva (unión de anexina V) a diferentes tiempos de incubación en medio Brackett con suplemento de Ca²⁺. Hubo diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) entre las barras de letra diferente.

Gráfica No.3



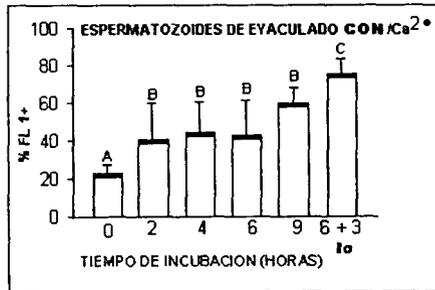
Porcentaje de espermatozoides de cola de epidídimo con fluorescencia (FL) positivas incubados a diferentes tiempos en medio Brackett con y sin Ca²⁺. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05).

Gráfica No. 4



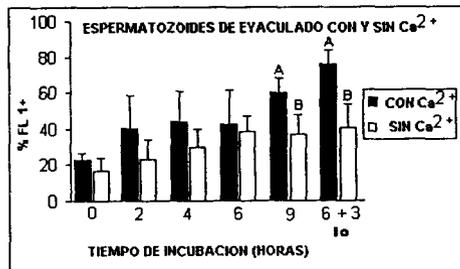
Porcentaje de espermatozoides de eyaculado con FL (+), incubados a diferentes tiempo en medio Brackett sin Ca^{2+} . Las letras diferentes sobre las barras muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Gráfica No. 5



Porcentaje de espermatozoides de eyaculado con FL (+), incubados a diferentes tiempo en medio Brackett con suplemento de Ca^{2+} . Las letras diferentes sobre las barras muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Gráfica No. 6



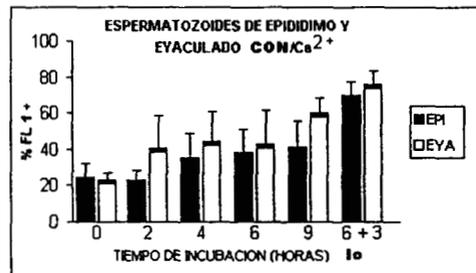
Porcentaje de espermatozoides de eyaculado con FL positivas incubados a diferentes tiempos en medio Brackett con y sin Ca^{2+} . Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Gráfica No. 7



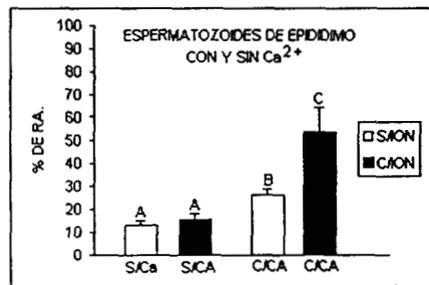
Porcentaje de espermatozoides de cola de epidídimo y eyaculado con FL positiva incubados diferentes tiempos en medio Brackett sin suplemento de Ca^{2+} . Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Gráfica No. 8



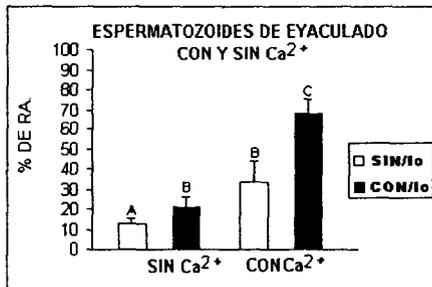
Porcentaje de espermatozoides de cola de epidídimo y eyaculado con FL positiva incubados diferentes tiempos en medio Brackett con Ca^{2+} . Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Gráfica 9.



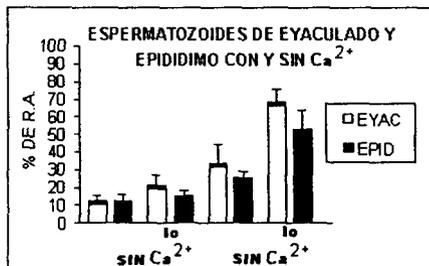
Porcentaje de espermatozoides de cola de epidídimo con reacción acrosomal incubados en medio con y sin Ca^{2+} y con y sin ionóforo. Hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) entre las barras de letra diferente.

Gráfica 10



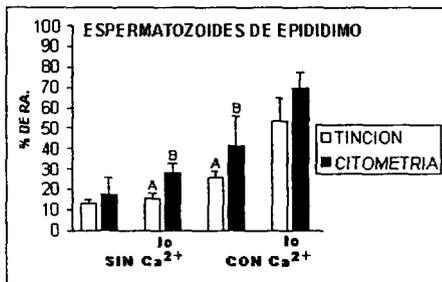
Porcentaje de espermatozoides de eyaculado con reacción acrosomal incubados en medio con y sin Ca²⁺ y con y sin ionóforo Hubo diferencias estadísticamente significativas (p<0.01) entre las barras de letras diferente.

Gráfica 11



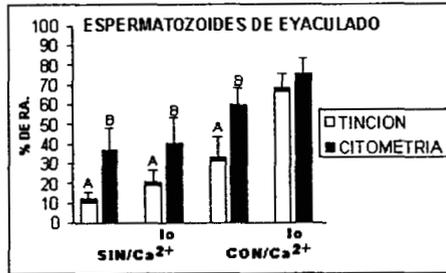
Comparación entre el porcentaje de espermatozoides de cola de epidídimo y eyaculado incubados en medio Brackett con y sin Ca²⁺ y con y sin ionóforo (no hubo diferencias estadísticas significativas) (p<0.05).

Gráfica 12



Porcentaje de espermatozoides de cola de epidídimo con reacción acrosomal incubados en medio con y sin Ca²⁺ y con y sin ionóforo (se hizo la comparación entre las dos técnicas) Hubo diferencias estadísticamente significativas (p<0.01) entre las barras de letra diferente.

Gráfica 13



Porcentaje de espermatozoides de eyaculado con reacción acrosomal incubados en medio con y sin Ca²⁺ y con y sin ionóforo (se hizo la comparación entre las dos técnicas) Hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) entre las barras de letra diferente.

VIII.-DISCUSIÓN.

Los espermatozoides de los mamíferos, incluyendo al humano, sufren una serie de cambios antes de que adquieran su habilidad fertilizante. Los dos eventos más importantes son la capacitación y la reacción acrosomal. Capacitación, es la modificación post-eyaculadora de la superficie del espermatozoide, la cual ocurre fisiológicamente en el tracto reproductivo femenino. Esta puede ser definida como los cambios bioquímicos de la membrana plasmática que le dan la preparación al espermatozoide para efectuar la reacción acrosomal. (Yanagimachi, 1981). Durante la capacitación hay una remoción gradual o alteración de las glicoproteínas periféricas, un rearrreglo de las proteínas integrales, una reducción del colesterol membranar y también ocurren, cambios en la distribución y composición de ciertos fosfolípidos de la membrana (Cooper, 1986; Yanagimachi, 1988). Los cambios en la distribución de los fosfolípidos de la membrana, que han sido sugeridos por diversos autores (Yanagimachi, 1988; Cooper, 1986), se hacen evidentes en nuestros resultados, de la gráfica No.2 y No.5 donde es claro que en los espermatozoides de eyaculado y epidídimo, incubados en un medio capacitante, se llevan a cabo movimientos de flip-flop en su membrana plasmática, lo cual produce pérdida de la asimetría membranar, presentando fosfatidilserina en la cara externa de la membrana cuando normalmente solo está en la cara interna (Farge, 1995). Este movimiento de flip-flop, detectado en este caso, por la unión de Anexina V-FICT a la fosfatidilserina, es mucho mas claro en las primeras 2 horas de incubación, para espermatozoides de eyaculado, y es hasta las 4 horas de incubación cuando se observan cambios estadísticamente significativos para el caso de los espermatozoides de cola de epidídimo, no obstante que para el resto de los tiempos las diferencias no fueron significativas, sí existe para los espermatozoides de ambas fuentes, una tendencia a aumentar la exposición de este fosfolípido. Estos experimentos demuestran que uno de los cambios membranarales que sufren los espermatozoides durante la capacitación *in vitro* es el movimiento de "flip flop" que se da en la membrana y que al menos la fosfatidilserina modifica su posición de la cara interna, a la externa.

Se sabe que los espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo de especies como el ratón, rata, carnero y conejo, tienen capacidad fertilizante (Knobil y col., 1994), sin embargo también es cierto que el proceso de eyaculación proporciona algunos cambios al espermatozoide que han sido detectados con el uso de lectinas. Los espermatozoides son

cubiertos por proteínas del plasma seminal producidas por las glándulas accesorias. Por ejemplo, los espermatozoides del humano adquieren lactoferrina (Hekman y col., 1969) y ferrisplan (Koyama y col., 1983), así como proteínas de 140 000 daltones durante el eyaculado. En el conejo se han encontrado proteínas de 20 000 daltones en los espermatozoides de eyaculado pero no en los de epidídimo (Oliphant G y col., 1979).

Muy probablemente, las sustancias que le proporcionan las glándulas accesorias a los espermatozoides de eyaculado de conejo, les da una mayor susceptibilidad para reaccionar más rápido al proceso de capacitación. Cuando en nuestro caso comparamos espermatozoides de epidídimo y de eyaculado (gráfica No.8), aunque no presentaron diferencias significativas en FL+ con respecto al tiempo entre ambos tipos de espermatozoides, sí se pudo observar que los espermatozoides de eyaculado respondieron más rápido (mayor incremento en la FL+), a la inducción *in vitro* de la capacitación espermática.

El Ca^{2+} extracelular, es requerido para inducir la capacitación espermática, aunque en mucho menor concentración que el que se requiere para la exocitosis acrosomal. El papel que tiene el calcio sobre la membrana plasmática del espermatozoide para iniciar la reacción acrosomal, podría ser su interacción con el sulfato de colesterol de la membrana, el cual ha mostrado que causa desestabilización de dicha membrana y forma intermediarios fusogénicos (Cheethm y col., 1990). Recientemente se ha podido demostrar que en la capacitación espermática, se encuentran involucradas no solamente modificaciones de la superficie celular del espermatozoide, sino que además se forman filamentos de actina en la membrana plasmática y en la cara externa de la membrana acrosomal, también se fija una fosfatidilinositol 4, 5 bifosfato fosfolipasa C específica y la unión de esta enzima es esencial para la fusión de la membrana plasmática y acrosomal externa, en la reacción acrosomal (Spungin y col., 1995).

Los iones de calcio juegan un importante papel en algunos procesos fisiológicos por su habilidad para regular la estructura y función de las membranas celulares (Comar y col., 1969) por sus acciones en algunas vías metabólicas, particularmente aquellas involucradas en los procesos de contractibilidad y metabolismo energético.

Desde hace algunos años se ha estudiado, la participación del calcio en eventos que modifican a la célula espermática para que ésta adquiera su capacidad fertilizante. Así se ha demostrado su participación en la maduración epididimaria (Morton y col., 1974), en la

regulación de su motilidad, en las propiedades membranales del espermatozoide eyaculado (Morita y col., 1970), y finalmente en los cambios metabólicos y estructurales que acompañan a la capacitación y la reacción acrosomal (Yanagimachi y col., 1974; Rogers y col., 1976, 1981).

Es conocido que el incremento en la concentración del Ca^{2+} citosólico, inducido por ionóforo A23187, o por incorporación de Ca^{2+} al medio, produce una distribución al azar de los lípidos de la membrana (Williamson y col., 1985 y Williamson, y col., 1992). El desorden que se produce en la membrana ocasiona pérdida de la asimetría de los fosfolípidos de la membrana y posteriormente la formación de vesículas. La relación entre vesiculación y translocación de fosfolípidos fue apoyada por experimentos que mostraron brotes espontáneos y vesiculaciones en liposomas después de que una inducción en la redistribución transmembranal de fosfolípidos (Farge y col., 1992).

También desde hace tiempo se conoce que ciertos ionóforos como el A23187 son capaces de unir y transportar cationes divalentes como el Ca^{2+} a través de barreras lipídicas, incluyendo membranas celulares (Case, y col., 1974), posteriormente se demostró que este ionóforo era capaz de incrementar el contenido de cAMP en células de la médula ósea. En virtud de la conocida relación del metabolismo del calcio con el cAMP, algunos autores decidieron utilizar a este ionóforo como inductor de la capacitación espermática (Reyes y col., 1978). Actualmente se sabe que con el uso de A23187, se induce la reacción acrosomal por un mecanismo regulatorio intracelular que produce un rápido y masivo influjo de Ca^{2+} .

En los experimentos del presente trabajo nosotros pudimos corroborar la importancia que juega el Ca^{2+} en el medio de incubación, para inducir la capacitación y la reacción acrosomal *In vitro*, medido por el aumento en la FL. que se traduce como una mayor exposición de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana de la célula espermática. En la Gráfica No.3 podemos observar que a partir de las 2 horas de incubación, siempre hubo un comportamiento regular en cuanto a la FL de los espermatozoides obtenidos de epidídimo, que fueron incubados en presencia de Ca^{2+} . Las diferencias fueron estadísticamente significativas, para todos los tiempos de incubación. En esta misma gráfica podemos apreciar también el efecto de la presencia de ionóforo A23187, como inductor de la reacción acrosomal, es claro que es este experimento el ionóforo hizo efecto solo en presencia de Ca^{2+} en el medio. En términos generales, el efecto del Ca^{2+}

en la capacitación y la reacción acrosomal fue similar en los espermatozoides de eyaculado y en los espermatozoides de la cola del epidídimo (Gráfica No.6), sin embargo en los espermatozoides de eyaculado solo hubo diferencias significativas por efecto del Ca^{2+} , hasta las 9 horas de incubación y cuando se adicionó ionóforo al medio.

En los espermatozoides que fueron incubados sin Ca^{2+} , sólo se observó aumento significativo de FL cuando se adicionó ionóforo de calcio A-23187 al medio de incubación con los espermatozoides obtenidos de epidídimo (Gráfica No.1), mientras que en los de eyaculado la diferencia no fue evidente (Gráfica No.4). Esta reacción que tienen los espermatozoides de epidídimo, con un aumento en FL (mayor porcentaje de espermatozoides reaccionados), al tratamiento de ionóforo, se puede deber a la movilización del calcio interno que promueve el ionóforo. Es muy probable que el ionóforo A-23187 haya sido capaz de movilizar Ca^{2+} citosólico intrínseco de los espermatozoide y así provocar este incremento en FL. Esto coincide con lo que recientemente reportan algunos autores (Spungin y col., 1996), quienes evidencian que tanto la membrana plasmática como la acrosomal contienen bombas de calcio las cuales remueven calcio del citosol ó bien debido a la combinación de este fenómeno y el hecho de que posiblemente exista una parte del proceso de la reacción acrosomal ,independientemente de calcio, como han reportado Leclerc y Kopf (1995) en experimentos realizados con espermatozoides estimulados para sufrir reacción acrosomal con zonas pelúcidas solubilizadas, se ha demostrado una adenil ciclasa unida a la membrana del espermatozoide, activada de manera calcio independiente (Leclerc y col., 1995), en otro trabajo se sugiere que esta adenilato ciclasa puede elevar las concentraciones de cAMP y en su momento abrir los canales de calcio del acrosoma. Esta movilización de Ca^{2+} , puede generar el primer incremento en la concentración de Ca^{2+} en los sitios de fusión, activando la unión de Fosfolipasa C a la membrana (Spungin y col., 1996). Consistentemente con esto, se ha demostrado que la actividad de Fosfolipasa C es inhibida por bloqueadores de los canales de calcio dependientes de voltaje, lo cual habla de la dependencia que esta enzima hacia el Ca^{2+} (Harrison y col., 1990). Las evidencias anteriores permiten sugerir que los primeros momentos de la reacción acrosomal pueden ocurrir sin el influjo de calcio y únicamente con la movilización del calcio intracelular, pero, sin embargo se requiere de la presencia de Ca^{2+} en el medio para consumir la reacción acrosomal.

En este trabajo, en todos los casos en los que se adicionó ionóforo a las muestras de espermatozoides previamente incubadas durante 6 horas en medio con Ca^{2+} y después de 3 horas de incubación con el ionóforo, se observaron incrementos francamente importantes en la FL. En las muestras de eyaculado con los mismos tiempos de incubación pero en ausencia de Ca^{2+} se observó una diferencia significativa entre las muestras incubadas por 6 horas y aquellas a las que se les incubó por 3 horas más en presencia de ionóforo.

La exocitosis que acompaña a la reacción acrosomal, es un proceso que al igual que en otras células, no es totalmente entendido (Mellman, 1994). Múltiples fusiones entre la membrana de las vesículas exocíticas (del acrosoma) y de la membrana plasmática, permiten la liberación de enzimas hidrolíticas, principalmente acrosina (Spungin y col., 1996).

En estudios reportados con eritrocitos se han podido demostrar que los aminofosfolípidos son transportados desde la cara externa hasta la cara interna de la membrana por una enzima dependiente de Mg^{2+} y ATP, la aminofosfolípido translocasa y que este movimiento es el responsable de la distribución asimétrica de los fosfolípidos en los eritrocitos, así como en la membrana de otras células eucarióticas (Devaux, 1990; Schroit y col., 1991). La aminofosfolípido translocasa es bloqueada por vanadato o cualquier inhibidor de ATP (Backer y col., 1987). Sin embargo un incremento en el Ca^{2+} citosólico, inducido por el tratamiento de los eritrocitos con A23187, promueve la distribución aleatoria de los lípidos en la membrana (Sulpice y col., 1994). El mecanismo por el cual el Ca^{2+} induce la redistribución de los lípidos de la membrana se desconoce hasta ahora, aunque Sulpice y col. (1994), encontraron que la extensa redistribución de lípidos ocasionada por el Ca^{2+} coincide con el aumento en el nivel de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato en la cara externa de la membrana de las vesículas.

Cuando se compararon los datos de citometría en los que se tomó la capacitación y la reacción acrosomal en función del porcentaje de espermatozoides que emitieron FL positiva; con los porcentajes de espermatozoides reaccionados según la tinción con azul de Comassie, se pudo comprobar que en todos los casos los datos de tinción mostraron siempre las mismas tendencias que los datos por citometría.

Los datos por tinción únicamente se leyeron después de 6 horas de incubación en presencia y ausencia de calcio y ionóforo. Como podemos ver en las gráficas 12 y 13 en donde se puede observar la efectividad de ambos métodos para estimar la reacción acrosomal, la citometría de flujo mostró ser un método más sensible para detectar espermatozoides reaccionados. Esta respuesta era de esperarse dado que a través de este método se pueden detectar cambios muy sutiles como es la presencia de fosfatidilserina en la cara externa de las vesículas formadas durante la reacción acrosomal. Para la mayoría de los tratamientos aplicados se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon ambos métodos, excepto cuando en el tratamiento se incluyó el ionóforo en el medio de incubación; es probable que bajo estas condiciones los cambios ocasionados en las membranas de los espermatozoides sean tan evidentes que pueden ser igualmente detectados por ambos métodos.

IX.- CONCLUSIONES.

- 1.- El mecanismo de “flip-flop” se presenta en la membrana plasmática del espermatozoide, durante el proceso de capacitación y reacción acrosomal.
- 2.- La pérdida de la asimetría de la membrana plasmática del espermatozoide, es favorecida de manera importante por la presencia de Ca^{2+} en el medio.
- 3.- No hay diferencias en la pérdida de la asimetría de la membrana plasmática, entre espermatozoides de cola de epidídimo y de eyaculado durante la capacitación y reacción acrosomal.
- 4.- El uso de la anexina V marcada con fluorocromos es un método eficiente y sensible, para evaluar por citometría de flujo los cambios membranales que se presentan en el espermatozoide durante la capacitación y reacción acrosomal.

X.- BIBLIOGRAFIA.

Adams CE, Chang MC. Capacitation of rabbit spermatozoa in the fallopian tube and the uterus . J. Exp Zool 1962, 151:159-165.

Albers, JJ.; Adolphson, JL. y Chen CH. Radio immunoassay of human plasma lecithin: cholesterol acyltransferase. J. Clin Invest., 1981, 67:141-148.

Alberts B; Dennis B; Lewis J; Raff M; Roberts K y James D. Watson. Biología molecular de la célula. Ed. Omega, Barcelona 1996.

Allen E. Studies on cell division in the albino rat. J. Morphol 1918, 31:133-185.

Anderson, RA, Johnson, SK, Bielfeld, P, Feathergill, KA. And Zaneveld, LJD. (1990) Characterization and inhibitor sensitivity of human sperm phospholipase A2: evidence against pivotal involvement of phospholipase A2 in the acrosome reaction. Mol Reprod Dev. 27,305-325.

Andree, HAM.; Chris PM.; Reutelingsperger; Rudolf H; Coenraad H. Hermens Th. Y George M. Willems. Binding of Vascular Anticoagulant a (VACA) to planar phospholipid bilayers. J. Biol. Chem. 1990, 265:4923-4928.

Austin, C.R. (1967) Capacitation of spermatozoa. Int J. Fertil., 12, 25-31.

Aveldano MI, Rotstein NP, Vermouth N. Lipid remodelling during epididymal maturation of rat spermatozoa. Biochem J 1992;283:235-241.

Babcock DF and Pfeiffer DR (1987). Independent elevation of cytosolic Ca and pH-sensitive mechanisms. J. Biol. Chem 262, 15041-15047.

Backer JM. Y Dawidowicz EA. Reconstitution of a phospholipid flippase from rat liver microsomes. Nature. 1987, 327:341-343.

Barros C. Capacitation of mammalian spermatozoa. " Physiology and Genetics of Reproduction ". New York Plenum Press, part B. pp3-24.

Bearer, EL y Friend DS. Modifications of anionic-lipid domains preceding membrane fusion in guinea pig sperm. J. Cell Biol. 1982, 92:604-615.

Bedford JM. Changes in the electrophoretic properties of rabbit spermatozoa during passage through the epididymis. Nature 1963; 200:1180.

Bedford JM. Calvin HI, and Cooper GW. The maturation of spermatozoa in the human epididymis. J Reprod Fertil (suppl) 1973;18:199-213.

Bedford, JD. Significance of the need of sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals. Biol. Reprod., 1983.28:108-120.

Behal A, Prakash K, Rao MR. Identification of a meiotic prophase-specific nuclear matrix protein in the rat. J Biol Chem 1987;262:10898-10902.

Belsey MA., Moghissi KS., Aliason RJ., Paulsen CA., Gallegos A. y Prasad MRN. Laboratory manual for the examination of human semen, cervical mucus interaction published by Press Concern Singapore.

Bennet, P.J., Moatti J.P., Mansat, A., Ribbes H., Cayrac J.C., Pontonnier F., Chap C. Y Douste-Blazy L. Evidence for the activation of phospholipases during acrosome reaction of human sperm elicited by calcium ionophore A23187. *Biochim. Biophys. Acta.* 1987, 919:255-265.

Birnbaumer L, Abramowitz J and Brown AM (1990). Signal transduction by G proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1031, 163-224.

Blackmore PF and Lattazio FA (1991). Cell surface localization of a novel non-genomic progesterone receptor on the head of human sperm. *Biochem Biophys Res Commun.* 181,331-336.

Blackmore PF, Beebe SJ, Danforth DR and Alexander NJ (1990). Progesterone and 17 hydroxiprogesterone. Novel stimulators of calcium influx in human sperm. *J Biol Chem*, 265, 1376-1380.

Blackmore PF, Neulen J, Lattazio F. And Beebe SJ (1991). Cell surface-binding sites for progesterone mediate calcium uptake in human sperm *J Biol Chem*, 266, 18655-18659.

Blackmore PF. (1993) Thapsigargin elevates and potentiates the ability of progesterone to increase intracellular free calcium in human sperm: possible role of perinuclear calcium. *Cell Calcium*, 14 53-60.

Brackett BG. y Oliphant G. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *1975 Biology of Reproduction* 12, 260-274 (1975).

Bredderman, P.J. Foote RH. Yassen AM. An improved artificial vagina for collecting rabbit semen. *J. Reproduction Fertility.* 7; 401- 403 (1967).

Brucker C, Berganer F, Kassner G, Lipford GB, Sandow BA and Hodgen GD (1992b). Monoclonal antibodies as fertilization inhibitors. *Adv Contracept Delivery Syst*, 81-6.

Brucker C, Sandow BA, Blackmore PF, Lipford GB and Hodgen GD (1992^a). Monoclonal antibody AG7 inhibits fertilization post sperm-zona binding. *Mol Reprod Dev* 33, 451-462.

Brucker, C, KaBner G, Löser C, Hinrichsen, M and Lipford GB (1994). Progesterone-induced acrosome reaction: potential role for sperm acrosome antigen 1 in fertilization. *Hum Reprod*, 9, in press.

Brucker, C. Y Lipford, GB. The human sperm acrosome reaction: physiology and regulatory mechanisms. An update. *Hum. Reprod. Update*, 1995, 1, 51-62.

Carmatini M, Colombo A, Bonfanti P. Identification of spectrin and calmodulin in rabbit, spermiogenesis and spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 1991;28:62-69.

Case GD, Vanderkooi JM, Scarpa A. Physical properties of biological membranes determined by the fluorescence of the calcium ionophore A23187. *Arch Biochem Biophys.* 1974, 162:174

Chang MC. Development of fertilizing capacity of rabbit spermatozoa in the uterus. *Nature (London)* 1955, 1:1036-1037.

Chang MC. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited in fallopian tubes. *Nature.* 1951, 168:997-998.

Cheetham JJ, Chen RJB and Epand RM (1990) Interaction of calcium and cholesterol sulphate induces membrane destabilization and fusion: implications for the acrosome reaction. *Biochim Biophys Acta*, 1024, 367-372.

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

Cherr GN, Lambert H, Meizel S and Katz DF (1986). In vitro studies of the golden hamster sperm acrosome reaction: Completion on the zona pellucida and induction by homologous soluble zonae pellucidae. *Dev Biol*, 114,119-131.

Cherr, G.N., Lambert, H., Meizel, S. and Katz, D.F. (1986). In vitro studies of the golden hamster sperm acrosome reaction: Completion on the zona pellucida and induction by homologous soluble zonae pellucidae. *Dev. Biol.*, 114, 119-131.

Clark EN, Corron, ME and Florman HM (1993). Caltrin, the calcium transport regulatory peptide of spermatozoa, modulates acrosomal exocytosis in response to the eggs zona pellucida. *J Biol Chem*, 268, 5309-5316.

Clausen O; Kirkhus B. y Abyholm T. DNA flow cytometry of human ejaculates in the investigation of male infertility. *Infertility* 5(1), 71-85 (1982).

Clegg, ED. Mechanisms of mammalian sperm capacitation. In Harman, JF. Ed. "Mechanism and control of animal fertilization". New York: Academic Press, 1983 pp 177-212.

Clermont Y. (1960). Cycle of the seminiferous epithelium of the ginea pig. A method for identification of stages. *Fertil Steril* 11:563-573.

Clermont Y. The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am J Anat*. 1963, 112:35-51.

Cooper GW, Bedford JM. Acquisition of surface change by the plasma membrane of mammalian spermatozoa during epididymal maturation. *Anat Rec* 1971; 169: 300-301

Cooper TG. The epididymis, sperm maturation and fertilization. New York: Springer Verlag; 1986:281.

Cooper, RA.; Arner, EC.; Wley, JS.; Shattil SJ. Modification of red cell membrane structure by cholesterol rich lipid dispersions. *J.Clin. Invest.*, 1975, 55:115-126.

Cox T and Peterson RN (1989). Identification of calcium conducting channels in isolated boar sperm plasm plasma membranes. *Biochem Biophys Res Commun*, 161, 162-168.

Cross NL, Morales, P, Overstreet JW and Hanson FW (1988). Induction of acrosome reaction by the human zona pellucida. *Biol Reprod*, 38, 235-244.

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

Cummins, J.M. and Yanagimachi, R. (1986) Developmwn of ability to penetrate the cumulus oophurus by hamster spermatozoa in vitro, in relation to the timing of the acrosome reaction. *Gamete Res.*, 15, 187-212

Daleke, DL y Huestis WH. *Biochemistry*. 1985, 24:5406-5416.

Davis, BK. Timing of fertilization in mamals. Sperm c/f ratio as a determination of the capacitation interval. *Proc Nat Acad Sci.*, 1981, 78:7560-7564.

Davis, BK. Uterine fluid proteins bind colesterol during capacitation in the rabbit. *Experientia*, 1982, 38:1063-1064.

Dawson RMC, Scott TW. Phospholipid composition of epididymal spermatozoa prepared by density gradient centrifugation. *Nature* 1964;202:292-293.

De Jonge CJ, Han HL, Mack SR and Zaneveld LJD (1991). Effect of phorbol diester synthetic diacilglycerols, and a protein kinase C inhibitor on the human sperm acrosome reaction. *J. Androl* 12, 62-70.

Delgado, NM.; Huacuja, L.; Pancardo, RM.; Merchant H. Y Rosado, A. Changes in the protein conformation of human spermatozoa membranes after tratment with cyclic 3'.5' monophosphate and human follicular fluid. *Fertil. Steril.*, 1976 27:413-420.

- Demel, RA y De Kruffyff, B. The function of sterols in membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1976, 166:24-40.
- Devaux PF, Zachowski, A., Morrot, G., Cribier, S., Fellman, P., Geldwerth, D., Bitbol, M. Y Herve, P. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1990, 12:517-522
- Dobrinski I; Hughes H y Barth D. Flow cytometric and microscopic evaluation and effect of fertility of abnormal chromatin condensation in bovine sperm nuclei.. *J. Of reproduction and fertility* 1994, 101, 531-538.
- Domino SE and Garbers DL (1989). Stimulation of phospholipid turnov in isolated sea urchin sperm heads by the fucose-sulfate glycoconjugate that induces an acrosome reaction. *Biol Reprod*, 40,133-141.
- Edwards RG, Ferguson LC, Cooms RRA. Blood group antigens on human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1964;7:153-61
- Evans RW, Weaver DE; Clegg ED. Diacyl, alkenyl and alkylether phospholipids in ejaculated, in utero-, and in vitro incubated porcine spermatozoa. *J Lipid Res* 1980;21:223-228.
- Fadok VA., Dennis RV., Pricilla AC., J. John C., Donna LB y Peter MH. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *The journal of immunology.* 1992, 148:2207-2216.
- Fadok VA.et al., *J. Immunol* 1992. 148:2207.
- Farge E. y PF. Devaux. Shape changes of giant liposomes induced by an asymmetric transmembrane distribution of phospholipids. *Biophys. J.* 1992, 61:347-357.
- Farge, E. Increased vesicle endocytosis due to an increase in the plasma membrane phosphatidylserine concentration. *Biophysical Journal.* 1995, 69:2501-2506.
- Fawcett DW, Phillips DM. Observations on the release of spermatozoa and on changes in the head during passage though the epididymis. *J Reprod Fertil (Suppl)* 1969;6:405-418.
- Fawcett DW. A comparative view of sperm ultrastructure. *Biol Reprod (Suppl)* 1970;2:90-127.
- Flechon JE (1985). Sperm surface changes during the acrosome reaction as observed by freeze fracture. *Am J Anat*, 174, 239-248.
- Flechon JE, Harrison RAP, Flechon B and Escaig J. (1986). Membrane fusion of ram spermatozoa. *J Cell Sci*, 81, 43-63.
- Fleming AD and Yanagimachi R. (1982). Fertile life of acrosome reacted guinea pig spermatozoa. *J Exp Zool.* 220,109-115.
- Fleming, A.D. and yanagimachi R. (1992) Fertile life of acrosome-reacted guinea pig spermatozoa. *J. Exp. Zool.*, 220, 109-115.
- Florman HM, Corron ME, Kim TD H and Babcock DF (1992). Activation of voltage dependent calcium channels of mammalian sperm is required for zona pellucida induced acrosomal exocytosis. *Dev Biol*, 152, 304-314.
- Fraser LR and McDermott CA (1992). Ca (2+) related changes in the mouse sperm capacitation state a possible role for Ca (2+) ATPase. *J Reprod Fertol*, 96, 363-377.
- Fraser, L. R. and McDermott, C.A. (1992) Ca(2+)-related changes in the mouse sperm capacitation state: a possible role for Ca(2+)-ATPase. *J. Reproduction fertil.* 96,363-377.
- Friend DS. (1986). Plasma-membrane diversity in a highly polarized cell *J Cell Biol*, 93,243-249.

Friend, DS. Membrane organization and differentiation in the guinea pig spermatozoa. In Van Blerkom, J. Y Motta, P. Eds. "Ultrastructure of reproduction". Boston:Martinus Nijhoff, 1984. pp.75-85.

Fry MR, Ghosh SS, East JM, and Franson RC (1992). Role of human sperm phospholipase A2 infertilization: Effects of a novel inhibitor of phospholipase A2 activity on membrane perturbations and oocyte penetration. *Biol Reprod*, 47, 751-759.

Furukawa K, Hotta Y. CDNA cloning of germ cell specific lamin B3 from mouse spermatocytes and analysis of its function by ectopic expression in somatic cells. *EMBO J* 1993;12:97-106.

GafoC y Garde JJ. Métodos de valoración de la capacitación y reacción acrosómica en mamíferos. *Med Vet*. 1994, 11: 201-210.

Garner DL; Gledhill BL; Pinkel D; Lake S; Stephenson D; Van Dilla MA. Lohnson LA.. Quantification of the X and Y chromosome bearing spermatozoa of domestic animals by flow cytometry. *Biol Reprod* 28:312-321, 1983.

Gerace L, Comeau C, Benson M. Organization and modulation of nuclear lamina structure. *J Cell Sci (suppl)* 1984;1:137-160.

Glassner M, Jones J, Kligman I, Woolkalis MJ, Gerton GL and Kopf, GS (1991). Immunocytochemical and biochemical characterization of guanine nucleotide binding regulatory proteins in mammalian spermatozoa. *Dev Biol* 146, 438-450.

Graham EF, Schmehl MKL y Nelson DS. Problems with laboratory assays *Proc Eighth NAAB Tech Conf AI Reprod*:59-66, 1980.

Graham JK; Kunze E y Hammerstedt. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biology of reproduction* 43, 55-64 1990.

Grimes SR Jr. Nuclear proteins in spermatogenesis. *Comp Biochem Physiol* 1986;83B:495-500.

Grundmann, U. *Proc Natl. Acad Sci. USA* 1988, 85:3708.

Grynkiewicz G, Poenie M and tsien RY (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescent properties. *J Biol Chem*, 260, 3440-3450.

Hafez ESE. y Garner DL., *Reproducción e inseminación artificial de los animales de granja*. 5ª. Ed. Interamericana, 1989.

Hammerstedt RH and Amann RP, (1976). Interconversions of steroids by intact bovine sperm and epididymal tissue. *Biol Reprod* 15 686-694.

Hammerstedt RH, Keith AD, Hay S, Deluca N, Amann RP. Changes in ram sperm membranes during epididymal transit. *Arch Biochem Biophys* 1979;196:7-12.

Harrison RA, Roldan ER, Lander DJ and Irvine RE (1990). Ram spermatozoa produce inositol 1,4,5-triphosphate but not inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate during the Ca²⁺/ionophore-induced acrosome reaction. *Cell Signal*, 2, 277-284.

Harrison RAP and Roldan ERS (1990). Phosphoinositides and their products in the mammalian sperm acrosome reaction. *J Reprod Fertil*, 42 (suppl) 51-67.

Haynes JL. Principles of flow cytometry. *Cytometry supplement* 17:7-17, 1988.

Hecht NB, Bower PA, Waters SH, Yelick PC, Distel RJ. Evidence for haploid expression of mouse testicular genes. *Exp Cell Res* 1986;164:183-190.

- Hekman A, Rumke P. The antigens of human seminal plasma with special reference to lactoferrin, a spermatozoa coating antigen. *Fertil Steril* 1969;20:312-323.
- Herrmann, A., Zachowski, A., Devaux, PF. Y Blumenthal. R. In *Cell and Model Membrane Interactions* (Ohki, S., Ed.) pp 89-113, Plenum Press, New York. 1991.
- Hoger TH, Krohne G, Franke WW. Amino acid sequence and molecular characterization of murine lamin B as deduced from cDNA clones. *Eur J Cell Biol* 1988;47:283-290.
- Holt WV, North RD. Thermotropic phase transitions in the plasma membrane of spermatozoa. *J. Reprod Fertil.* 1986, 78:447-457.
- Homan, R. Y Pownall, HJ. *Biochim. Biophys. Acta.* 1988, 938:155-166.
- Huacuja, L.; Delgado, NM.; Wans, MA.; Pedron N. Y Rosado A. Exchange of lipids between spermatozoa and seminal plasma in normal and pathological human semen. *Arch. Androl.* 1981.
- Hubbell, WL. *Biophys. J.* 1990, 57:99-108.
- Irvine DS and Aitken RJ (1986). Measurement of intracellular calcium in human spermatozoa. *Gamete Res*, 15, 57-71.
- Irvine RF and Moor RM (1987). Inositol (1,3,4,5) tetrakisphosphate induced activation of sea urchin eggs requires the presence of inositol trisphosphate. *Biochem Biophys Res Commun*, 146, 284-290.
- Kawai Y; Ohnishi S; Miyake M; Hama T y Mayumi T. Flow cytometric Analysis of mouse sperm using monoclonal anti-sperm antibody A-1. *Molecular reproduction and development* 37:293-298 (1994).
- Kerek G, Biberfeld P, Afzelius BA. Demonstration of HL- A antigens, "species," and "semen" –specific antigens on human spermatozoa. *Int J Fertil* 1973;18:145-155.
- Khan AA, Steiner JP, Klein MG, Schneider MF and Snyder SH (1992). IP3 receptor: localization to plasma membrane of T cells and cocapping with the T cell receptor. *Science*, 257,815-818.
- Knobil, E. y Neill, J.D., (1994). *The Physiology of Reproduction*, 2^a. edic., Ed. Raven Press. New York.
- Koehler JK. Human sperm head ultrastructure: A freeze-etching study. *J Ultrastruct Res* 1972;39:520-539.
- Kopf GS, Woolkalis MJ and Gerton GL (1986). Evidence for a guanine nucleotide binding regulatory protein in invertebrate and mammalian sperm. Identification by islet-activating protein catalyzed ADP ribosylation and immunochemical methods. *J Biol Chem* 261, 7327-7331.
- Kornberg, RD. Y McConnell, HM. *Biochemistry.* 1971. 10:1111-1120
- Koyama Y, Takuda Y, Takamura T, Isojima S. Localization of human seminal plasma No. 7 antigen (ferrisplan) in accessory glands of the male genital tract. *J Reprod Immunol* 1983;5:135-143.
- Kuzan FB, Fleming AD and Seidel GE (1984). Successful fertilization in vitro of fresh intact oocytes by perivitelline (acrosome reacted) spermatozoa of the rabbit. *Fertil Steril*, 41, 766-770.
- Kuzan, F.B., Fleming, A.D. and Seidel, G.E. (1984) Successful fertilization in vitro of fresh intact oocytes by perivitelline (acrosome-reacted) spermatozoa of the rabbit. *Fertil. Steril.*, 41, 766-770.
- Laglais, J., Zollinger, M., Plante, L., Chapdelaine, A., Bleau, G. and Roberts, K. D. (1981) Localization of cholesteryl sulfate in human spermatozoa in support of a hypothesis for the mechanism of capacitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 7266-7270.

- Lalumiere G, Bleau G, Chapdelaine A, Roberts KD. Cholesterol sulfate and sterol sulphatase in the human reproductive tract. *Steroids* 1976;27:247-260.
- Langlais J, Zollinger M, Plante L, Chapdelaine A, Bleau G and Roberts KD (1981). Localization of cholesteryl sulfate in human spermatozoa in support of a hypothesis for the mechanism of capacitation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78:7266-7270.
- Langlais, J. Y Roberts KD. A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete. Res.* 1985, 12:188-224.
- Lanini L, Bachs O and Carafoli E. (1992). The calcium pump of The liver nuclear membrane is identical to that of endoplasmic reticulum *J Biol Chem*, 267, 11548-11552.
- Lebkowski YS, Laemmli UK. Non-histone proteins and longrange organization of Hela interphase DNA. *J Mol Biol* 1982;156:121-141.
- Leclerc, P. Y Kopf GS. Mouse sperm adenyl cyclase: general properties and regulation by the zona pellucida. *Biol. Reprod.* 1995, 52:1227-1233.
- Lee MA, Cheek JH and Kopf GS (1992). A Guanine nucleotide binding regulatory protein in human sperm mediates acrosomal exocytosis induced by the human zona pellucida. *Mol Reprod Dev*, 31, 78-86.
- Legault Y, Bouthillier M, Bleau G, Chapdelaine A, Roberts KD. Thesterol and sterol sulfate content of the male hamster reproductive tract. *Biol Reprod* 1979;20:1213-1219.
- Legault, Y.; Pleau, G.; Chapdelaine, A. y Roberts, KD. Steroid sulfatase activity of the hamster reproductive tract during the estrous cycle. *Biol. Reprod.*, 1980, 23:720-725.
- Leiton L, LeGuen P, Bunch D and Saling PM (1992). Regulation of mouse gamet interation by a sperm tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89,11692-11695.
- Levy, RI. Cholesterol, lipoproteins, apoproteins, and heart disease: Present status and future prospects, *Clin. Chem.*, 1981, 27:653-662.
- Leyton L, LeGuen P, Bunch D, Saling PM. Regulation of mouse gamete interaction by sperm tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992, 89:11692-11695.
- Leyton L. y Saling PM. 95kd sperm proteins bind zp3 and serve as tyrosine kinase substrates in response to zona binding. *Cell*. 1989, 57:1123-1130.
- Llanos M, Vigil P, Salgado AM and Morales P (1993). Inhibition of the acrosome reaction by trypsin inhibitor and prevention of penetration of spermatozoa though the human zona pellucida. *J Reprod Fertilit*, 97, 173-178.
- López ML, de SouzaW, Bustos-Obregon E. Cytochemical analysis of the anionic sites on the membrane of the stallion spermatozoa during the epididymal transit. *Gamete res* 1987; 18: 319-332.
- McKeon FD, Kirschner MW, Caput D. Homologies in both primary and secondary structure between nuclear envelope and intermediate filament proteins. *Nature* 1986;319:463-468.
- Meizel S and Turner KO (1991) Progesterone acts at the plasma membrane of human sperm. *Mol Cell Endocrinol* 11,R1-R5.
- Meizel S and turner KO (1993). Initiation of the human sperm acrosome reacton by thapsigargin. *J Exp Zool*, 267, 350-355.
- Meizel S. Molecules that initiate or help stimulate the acrosome reaction by their interaction with the mammalian sperm surface. *Am J Anatomy*. 1985, 174:258-302

- Meizel, S. The mammalian acrosome reaction. A Biochemical approach. In *Development in Mammals*, Vol. 3, Johnson, MH. Ed. North- Holland, Amsterdam. 1978, pp.1-64.
- Mellman, I. Membranes and sorting. *Curr. Opin, Cell Biol.* 1994, 6:497-498.
- Mendoza C, Moos J and Tesarik J. (1993). Progesterone action on the human sperm surface is potentiated by an egg-associated acrosin activator. *FEBS Lett*, 326,149-152.
- Mercado, E.; Hicks, JJ.; Drago, C. Y Rosado, A. A study of the interaction of human spermatozoa membrane with ATP and Cyclic-AMP. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1974, 56:185-188.
- Moore HDM. The net negative surface charge of mammalian spermatozoa as determined by isoelectric focusing. Changes following sperm maturation, ejaculation, incubation in the female tract, and after enzyme treatment. *Int J Androl* 1979;2:244-262.
- Morales P, Cross NL, Overstreet JW and Hanson FW. (1989). Acrosome intact and acrosome reacted human sperm can initiate binding to the zona pellucida. *Dev Biol* 133, 385-392.
- Morales, P., Cross, N.L., Overstreet, J.W. and Hanson, F.W. (1989) Acrosome-intact and acrosome-reacted human sperm can initiate binding to the zona pellucida. *Dev. Biol.*, 133, 385-392.
- Morton B, Harrigan-Lum J, Albagli L, Jooss T: The activation of motility in quiescent hamster sperm from the epididymis by calcium and cyclic nucleotides. *Biochem Biophys Res Commun.* 1974, 56:372.
- Mukerjee AB and Lippes J (1972) Effect of human follicular and tubal fluids on human, mouse and rat spermatozoa in vitro. *Can J Genet Cytol*, 14, 167-174.
- Müller-Esterl W, Fritz H. Sperm acrosin. In: Lorand L, ed. *Methods in enzymology*, vol 80. New York: Academic Press; 1981:621-632.
- Nishizuka Y (1984). The role of the protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature*, 308, 693-698.
- Oliphant G, Singhas CA. Iodination of rabbit sperm plasma membrane: relationship of specific surface proteins to epididymal function and sperm capacitation. *Biol Reprod* 1979;21:937-944.
- Oliphant, G. Removal of sperm bound seminal plasma components as a prerequisite to induction of the acrosomal reaction. *Fertil. Steril.*, 1986, 27:28-38.
- Olson GE, Danzo BJ. Surface changes in rat spermatozoa during epididymal transit. *Biol Reprod* 1981;24:431-443.
- Olson GE, Hamilton DW. Characterization of the surface glyco proteins of rat spermatozoa. *Biol Reprod* 1978; 19:26-35.
- Olson GE, Winfrey VP, Garbers DL, Noland TD. Isolation and characterization of a macromolecular complex associated with the outer acrosomal membrane of bovine spermatozoa. *Biol Reprod* 1985;33:761-779.
- Opden Kamp, JAF. *Annu. Rev. Biochem.* 1979. 48:47-71.
- Osman RA, Andria ML, Jones AD and Meizel S (1989). Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun*, 160, 828-833.
- Paonessa G, Metafora G, Tajana G, et al. Transglutaminase mediated modifications of the rat sperm surface in vitro. *Science* 1984;226:852-855.
- Pillai MC and Meizel S (1991). Trypsin inhibitors prevent the progesterone initiated increase in intracellular calcium required for the human sperm acrosome reaction. *J Exp Zool*, 258, 384-393.

Quinn PJ, White IG. Phospholipid and cholesterol content of epididymal and ejaculated ram spermatozoa and seminal plasma in relation to cold shock. *Aust J. Biolo Sci* 1967;20:1205-1215.

Regaud C. Studies sur la structure des tubes seminiferes et sur la spermatogenese chez les mammiferes. *Arch Anat Microsc.* 1901, 4:101-156.

Reyes A.; Goicoechea B. Y Rosado A. Calcium requirement for rabbit spermatozoal capacitation and enhancement of fertilizing ability by ionophore a23187 and cyclic adenosine 3':5'-monophosphate. *Fertility and Sterility.* 1978, 29:451-455.

Ribbes H, Plantavid M, Bennet PJ, Chap H and Douste-Blazy L (1987). Phospholipase C from human sperm specific for phosphoinositides. *Biochim Biophys Acta*, 919, 245-254.

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

Rogers BJ, Yanagimachi R. Competitive effect of magnesium on the calcium-dependent acrosome reaction in guinea pig spermatozoa. *Biol. Reproduction* 1976, 15:614.

Roldan ER and Harrison RA (1988). Absence of active protein kinase C in ram spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun*, 155, 13962-13970.

Roldan ERS and Harrison RAP (1989). Polyphosphoinositide breakdown and subsequent exocytosis in the Ca²⁺/ionophore induced acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Biochem J.* 259,397-406

Roldan ERS and Harrison RAP (1990). Diacylglycerol and phosphatidate production and the exocytosis of the sperm acrosome. *Biochem Biophys Res Commun*, 172, 8-15.

Roldan ERS and Harrison RAP (1992). The role of diacylglycerol in the exocytosis of the sperm acrosome. Studies using diacylglycerol lipase and diacylglycerol kinase inhibitors and exogenous diacylglycerol. *Biochem J*, 281, 767-773.

Roldan ERS y Fragio C. Phospholipase A2 activation and subsequent exocytosis in the Ca²⁺ /ionophore-induced acrosome reaction of ram spermatozoa. *J. Biol Chem.* 1993, 258.13962-13970.

Roldan ERS y Mollinedo F. Diacylglycerol stimulates the Ca²⁺ dependent phospholipase A2 of ram spermatozoa. *Biochem. Biophys Res. Commun.* 1991, 176:294-300.

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

Rotem R, Paz GE, Homonnai ZT, Kalina M and Naor Z (1990). Protein Kinase C is Present in human sperm: possible role in flagellar motility. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87, 7305-7308.

Russell L, Peterson RN, Freund M. On the presence of bridges linking the inner and outer acrosomal membranes of boar spermatozoa. *Anat Rec* 1979;198:449-459.

Saling PM (1989). Mammalian sperm interaction with extracellular matrices of the egg. *Oxford Rev Reprod Biol*, 11, 339-388.

Saling PM (1991). How the egg regulates sperm function during gamete interaction: facts and fantasies. *Bol Reprod*, 44, 246-251.

Saling PM and Lakoski KA (1985). Mouse sperm antigens that participate in fertilization. II. Inhibition of sperm penetration through the zona pellucida using monoclonal antibodies. *Biol Reprod*, 33, 527-236.

- Saling, P.M. (1989) Mammalian sperm interaction with extracellular matrices of the egg. *Oxford Rev. Reprod. Biol.* 11, 339-388.
- Saling, P.M. and Storey, B.T. (1979) Mouse Gamete interactions during fertilization in vitro: cholortetracycline as a fluorescent probe for the mouse sperm acrosome reaction. *J. Cell Biol.*, 83, 544-555.
- Schackman RW and shapiro BM (1981) A partial sequence of ionic changes associated with the acrosome reaction of *Strongylocentrotus purpuratus*. *Dev Biol*, 81, 145-154.
- Schackman RW, Eddy EM and Shapiro BM (1978). The acrosome reaction of *Strongylocentrotus purpuratus* sperm: ion requirements and movements. *Dev Biol*, 65, 483-495.
- Schneider, E., Haest, CWM., Plasa, G. y Deuticke, B. *Biochim. Biophys. Acta.* 1986, 855:325-336.
- Schroit AJ, Zwaal RFA. Transbilayer movement of phospholipids in red cell and platelet membranes. *Biochim Biophys Acta.* 1991, 1071:313
- Schwarz MA, Koehler JK. Alterations in lectin binding to guineapig spermatozoa accompanying in vitro capacitation and the acrosome reaction. *Biology of reproduction* 1976;21:1295-1307.
- Scott TW, Voglmayr JK, Stechell BP. Lipid Composition and metabolism in testicular and ejaculated ram spermatozoa. *Biochem J* 1967;102:456-461.
- Seigneuret, M. Y PF. Devaux. ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane. Relation to shape change. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1984, 71:3751-3755.
- Shur BD and Neely CA (1988). Plasma membrane association, purification and partial characterization of mouse sperm B-1-4-galactosyltransferase. *J Biol Chem*, 263, 17706-17714.
- Siiteri JE, Dandekar P and Meizel S (1988). Human sperm acrosome reaction-initiating activity associated with the human cumulus oophorus and mural granulosa cells. *J Exp Zool*, 246, 71-80.
- Singer SL, Lambert H, Overstreet JW, Hanson FW and Yanagimachi R (1985). The kinetic of human sperm binding to the human zona pellucida and zona-free hamster oocyte in vitro. *Gamete Res*, 12, 29-39.
- Singer, S.L., Lambert, H., Overstreet, J. W., Hanson, F.W. and yanagimachi, R. (1985). The kinetics of human sperm binding to the human zona pellucida and zona-free hamster oocyte in vitro. *Gamete Res.*, 12, 29-39.
- Smith, T.T. y Warren, B.N. Role of Direct Contact between Spermatozoa and Oviductal Epithelial Cells in Maintaining Rabbit Sperm Viability. *Biology of Reproduction* 56,83-89 (1997).
- Spungin B, Margalit, I y Breitbart, H. Sperm exocytosis reconstructed in a cell-free system: evidence for the involvement of phospholipase C and actin filaments in membrane fusion. *J. Cell Sci.* 1995, 108:2525-2535.
- Spungin B. Y Haim Breitbart. Calcium mobilization and influx during sperm exocytosis. *J. Of Cell Science.* 1996, 109:1947-1955.
- Stackpole CW, Devorkin D. Membrane organization in mouse spermatozoa revealed by freeze-etching. *J Ultrastruct Res* 1974;49:167-187.
- Stick R. Schwarz H. The disappearance of the nuclear lamina during spermatogenesis: An electron microscopic and immunofluorescence study. *Cell Differ* 1982;11:235-243.
- Storey BT, Hourani CL and Kim JB (1992). A transient rise in intracellular Ca²⁺ is a precursor reaction to the zona pellucida induced acrosome reaction in mouse sperm and is blocked by the induced acrosome reaction inhibitor 3-quinuclidinyl benzilate. *Mol Reprod Dev*, 32, 41-50.

Storey Bt, Lee MA, Muller C, Ward CR and Wirtshafter DG (1984). Binding of mouse spermatozoa to the zonae pellucidae of mouse eggs in cumulus: evidence that the acrosomes remain substantially intact. *Biol Reprod*, 31, 1119-1128.

Storey, B.T., Lee, M.A., Muller, C., Ward, C. R. and Wirtshafter, D.G. (1984) Binding of mouse spermatozoa to the zona pellucidae of mouse eggs in cumulus—evidence that the acrosomes remain substantially intact *Biol. Reprod.*, 31, 1119-1128.

Suarez SS, Meizel S, y Wolf DP. Induction of the acrosome reaction in human spermatozoa by a fraction of human follicular fluid. *Gamete Res.* 1986, 14:107-122.

Sugimura, M et al., *Bood Coag. Fibrinolysis* 1994.5:365.

Sullivan R, Ross P and Bérubé B (1989). Immunodetectable galactosyltransferase is associated only with human spermatozoa of high buoyant density. *Biochem Biophys Res Commun*, 162,184-188.

Sulpice JC., Alain Z., Philippe FD y Françoise G. Requirement for phosphatidylinositol 4,5-Biphosphate in the Ca^{2+} -induced phospholipid redistribution in the human erythrocyte membrane. *The Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 1994, 269:6347- 6354.

Swanson EW. Berden HJ. An eosin nigrosin stain for differentiating live and dead bovine spermatozoa. *J. animal Sci.* 10: 981-87 (1951).

Tesarik J (1985). Comparison of acrosome reaction inducing activities of human cumulus oophorus, follicular fluid and ionophore a23187 in human sperm populations of proven fertilizing ability in vitro. *J Reprod Fertil*, 74, 383-388.

Tesarik J and Mendoza C (1993). Insights into the function of a sperm-surface progesterone receptor: Evidence of ligand-induced receptor aggregation and the implication of proteolysis. *Exp Cell Res*, 205, 111-117.

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

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

Tesarik J, Moos J and Mendoza C (1993^a) Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by a progesterone receptor on the cell surface of human sperm. *Endocrinology*, 133, 328-335.

Tesarik, J. From the cellula, to the molecular dimension: The actual challenge for human fertilization research. *Gamete Res.*, 1986, 13:47-89.

Thakkar JK, East J and Franson RC (1984). Modulation of phospholipase A2 activity associated with human sperm membranes by divalent cations and calcium antagonists. *Biol Reprod*, 30, 679-686.

Thakkar JK, East J, Seyler D, Franson RC. Surface active phospholipase A2 in mouse spermatozoa. *Biochim Biophys Acta* 1983;754:44-50.

Thakkar JK, East, J. Y Franson R.C. Modulation of phospholipase A2 activity associated with human sperm membranes by divalent cations and calcium antagonists. *Biol Reprod.* 1984, 30:679-686.

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

Thomas P and Meizel S (1989). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis in human sperm stimulated with follicular fluid or progesterone is dependent upon Ca^{2+} influx. *Biochem J*, 264, 539-546.

- Thompson, TE in *Molecular Specialization and Symmetry in membrane function* (Solomon, AK y Karnovsky, M. Eds) pp78-98, Harvard University Press, Cambridge MA. 1978.
- Tortora, G.J. y Anagnostakos, N.P. (1993). *Principios de anatomía y fisiología*. 6a. edic. Ed. HARLA. Pp.1206. Colombia.
- Tortora, GJ y Nicholas P. *Principios de anatomía y fisiología* 6ª ed. Ed:HARLA, México, 1993.
- Tsien RY (1980). New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: Designs, synthesis and properties of prototype structures. *Biochemistry*, 19, 2396-2404.
- Tsien RY (1981). A non disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature* 290, 527-528.
- Tulsiani DRP, Skudlarek MD and Orgebin- Crist MC (1990). Human sperm plasma membranes possess a-D-mannosidase activity but no galactosyltransferase activity. *Biol Reprod*, 42, 843-858.
- Velez, JF. Human spermatozoa selection in improved discontinuous percoll gradients. *Fertility and sterility* 56: 4, 737-742 (1991).
- Vermes I., Clemens H., Helga S., Chris R., A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of immunological Methods*. 1995, 184:39-51.
- Viurba M, Rajaniemi H. Radioiodination of surface proteins of bull spermatozoa and their characterization by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Reprod Fertil* 1980;58:483-489.
- Ward CR, Storey BT and Kopf GS (1992). Activation of a G1 protein in mouse sperm membranes by solubilized proteins of the zona pellucida, the eggs extracellular matrix. *J Biol Chem*, 267, 14061-14067.
- Ward WS, Coffey DS. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: Comparison With somatic cells *Biol Reprod* 1991;44:569-574.
- Watson EA y Erba E. *Flow cytometry in animal cell culture. A practical approach* 2da. Ed. Editado por Freshney RI. IRL Press, Oxford University Press, pg. 165-212. 1994.
- Williamson, P.; Kulick, A.; Zachowski, A.; Schlegel, RA and Devaux, PF. *Biochemistry*. 1992, 31:6355-6360.
- Williamson, P.; Algarin L.; Bateman J.; Choe HR. Y Schlegel, RA. *J. Cell Physiol*, 1985, 123:209-214.
- Wistrom, CA. Y Meizel S. Evidence suggesting involvement of a unique human sperm steroid receptor/Ci-channel complex in the progesterone-initiated acrosome reaction. *Dev. Biol.*, 1993, 159:679-690.
- Wolf DE; Maynard VM; McKinnon CA y Melchior DL. Lipid domains in the ram sperm plasma membrane demonstrated by differential scanning calorimetry. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 87:6893-6896, 1990.
- Yanagimachi R y N. Usi. Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. *Exp Cell Res*. 1974, 89:169-174.
- Yanagimachi R. Mechanisms of fertilization in mammals. En : Mastroianni, L. y Biggers, JD. *Fertilization and embryonic development In vitro*. Plenum Press, New York. 1981:81.
- Yanagimachi R. Noda YD, Fujimoto M, Nicolson G. The distribution of negative surface charges on mammalian spermatozoa. *Am J. Anat* 1972; 135: 497-520.
- Yanagimachi, R (1994) *Mammalian fertilization: In Knobil, E. and Neill, J. D. (eds), Physiology of Reproduction, Vol 1* Raven Press.

Yanagimachi, R. Mammalian fertilization: In Knobil, E. and Neill JD. (eds), *Physiology of Reproduction*, Vol. A. Raven Press, New York, 1988 pp. 135-185.

Yudin AI, Gottlieb W y Meizel S. Ultrastructural studies of the early events of the human sperm acrosome reaction as initiated by human follicular fluid. *Gamete Res.* 1988. 20:11-24.