

## Tesis de Posgrado

# Estudio de los mecanismos involucrados en el proceso de maduración del espermatozoide

Cuasnicú, Patricia S.

1983

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Cuasnicú, Patricia S.. (1983). Estudio de los mecanismos involucrados en el proceso de maduración del espermatozoide. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1799\\_Cuasnicu.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1799_Cuasnicu.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Cuasnicú, Patricia S.. "Estudio de los mecanismos involucrados en el proceso de maduración del espermatozoide". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1983. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1799\\_Cuasnicu.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1799_Cuasnicu.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**Tesis presentada para optar  
al título de Doctora en Ciencias Químicas**

**ESTUDIO DE LOS MECANISMOS INVOLUCRADOS  
EN EL PROCESO DE MADURACION  
DEL ESPERMATOZOIDE**

**Autor: Lic. Patricia S. Cuasnicú  
Director: Dr. Jorge A. Blaquier**

**1983**

1799  
L. S.

**Instituto de Biología y Medicina Experimental  
Obligado 2490, Buenos Aires, Argentina**

**A mis padres**

Llegará una época en la que una investigación diligente y prolongada sacará a la luz cosas que hoy están ocultas.... Llegará una época en la que nuestros descendientes se asombrarán de que ignorábamos cosas que para ellos son tan claras.... Muchos son los descubrimientos reservados para las épocas futuras, cuando se haya borrado el recuerdo de nosotros.... Nuestro universo sería una cosa muy limitada si no ofreciera a cada época algo que investigar.... La naturaleza no revela sus misterios de una vez para siempre.

Séneca, Cuestiones naturales

libro 7, siglo primero.

## INDICE

	Página
<u>INTRODUCCION</u>	1
Estructura del espermatozoide	3
Aparato genital masculino	9
Histología y fisiología del epidídimo	14
El epidídimo como órgano efector de andrógenos	23
Proceso de maduración del espermatozoide	27
Capacitación y reacción acrosomal del espermatozoide	53
Estructura del ovocito	61
Proceso de fertilización	65
<u>OBJETIVOS</u>	81
<u>MATERIALES Y METODOS</u>	88
Primera Parte	88
Animales y Tratamiento	88
Drogas y soluciones	89
Marcación in vitro de las proteínas	91
Preparación de los citosoles	92
Extracción de proteínas de la superficie del espermatozoide	93
Análisis electroforético	95
Densitometría	100
Cálculo de los pesos moleculares de las proteínas	101
Ensayo de tinción de PAS	102
Segunda Parte	
Animales y Tratamiento	103
Drogas y soluciones	104
Obtención y preparación de los ovocitos	108
Obtención y preparación de espermatozoides	109
Delimitación de los distintos segmentos epididimarios	110
Ensayo de unión de espermatozoides a la zona pelúcida de los ovocitos	110
Inseminación <u>in vivo</u> de los espermatozoides	114
Elección del <u>criterio</u> de fertilización	114
Perfiles de capacidad de unión y de capacidad fertilizante	116
Preparación de la fracción enriquecida en PE <sub>1-6</sub>	117
Cultivo de órgano	118

Síntesis de proteínas en cultivo	121
Control histológico- Morfometría	123
Ensayo de peroxidasa anti-peroxidasa	124
Tratamiento estadístico de los datos	125

## RESULTADOS

### Primera Parte

Identificación de proteínas epididimarias andrógeno-dependientes	126
Efecto de diferentes períodos de castración y reinducción sobre la concentración de PE <sub>1-6</sub>	130
Estudios de origen y especificidad de las proteínas PE <sub>1-6</sub>	135
Interacción de las proteínas PE <sub>1-6</sub> con los espermatozoides	138
Aparición de las proteínas epididimarias PE <sub>1-6</sub> en función de la edad	141
Caracterización parcial de las proteínas PE <sub>1-6</sub>	144

### Segunda Parte

Ensayo de unión de espermatozoides a la zona pelúcida	148
Determinación de la capacidad fertilizante de los espermatozoides	151
Perfiles de maduración	155
Perfil epididimario de capacidad de reconocimiento y unión al ovocito	156
Perfil epididimario de capacidad fertilizante	158
Desarrollo del sistema de cultivo	161
Estudio histológico del túbulo epididimario en cultivo	167
Efecto del tiempo de cultivo sobre la motilidad de los espermatozoides de las distintas regiones epididimarias	170
Capacidad fertilizante de los espermatozoides luego de 24 hs de cultivo	172
Estimulación androgénica de los túbulos epididimarios en cultivo	176
Efecto de los andrógenos sobre la morfología del túbulo epididimario	176
Efecto de los andrógenos sobre la síntesis de proteínas en cultivo	181

Efecto del andr3geno sobre la capacidad de uni3n de los espermatozoides	185
Especificidad de efecto del andr3geno sobre la capacidad de uni3n de los espermatozoides	188
Efecto de la cicloheximida sobre la capacidad de uni3n de los espermatozoides	190
Efecto de las prote3nas epididimarias sobre la capacidad de uni3n de los espermatozoides	192
Efecto del agregado de andr3genos y prote3nas sobre la capacidad fertilizante de los espermatozoides	197
Resultados obtenidos utilizando a la rata como animal de experimentaci3n	201
Desarrollo de los ensayos biol3gicos	201
Perfil de fertilidad	204
Mantenimiento de t3bulos epididimarios de rata en cultivo de 3rgano	207
Efecto de las prote3nas DE sobre la capacidad fertilizante del espermatozoide inmaduro	209
Penetraci3n de anti-DE en los t3bulos cultivados y su efecto sobre la capacidad fertilizante de espermatozoides maduros	210
Estudio inmunohistoqu3mico de los espermatozoides	212
<u>DISCUSION</u>	214
Primera Parte	214
Segunda Parte	229
CONCLUSIONES	251
BIBLIOGRAFIA	254
AGRADECIMIENTOS	288

## ABREVIATURAS

ABP	Proteína ligadora de andrógenos
Acetato de ciproterona	6 $\alpha$ -cloro-17 $\alpha$ -hidroxi-1 $\alpha$ ,2 $\alpha$ metilen-4,6 pregnadien-3,20 diona-17-acetato
B <sub>1</sub>	cuerpo proximal del epidídimo
B <sub>2</sub>	cuerpo distal del epidídimo
BMOC	medio salino Brinster
BPB	azul de bromofenol
BSA	albúmina sérica bovina
Con A	Concanavalin-A
c pm	cuentas por minuto
DAB	tetracloruro de 3-3' diamino bencidina
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DNA	ácido desoxiribonucleico
5 $\alpha$ -DHT	5 $\alpha$ Androstano 17 $\beta$ ol-3-ona (5 $\alpha$ Dihitrotestosterona)
3 $\alpha$ diol	5 $\alpha$ Androstano 3 $\alpha$ , 17 $\beta$ diol
3 $\beta$ diol	5 $\alpha$ Androstano 3 $\beta$ , 17 $\beta$ diol
dpm	desintegraciones por minuto
DTT	Ditiotreitol
esp.	espermatozoide/s
GPC	glicerofosforilcolina
H	cabeza del epidídimo
HCG	gonadotropina coriónica humana
Kr	coeficiente de retardación
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleótido fosfato, reducida
OA	ovoalbúmina
PAP	Peroxidasa-anti-Peroxidasa
PBS	buffer fosfato salino
PE	proteínas epididimarias (del hamster)
PEE	proteínas epididimarias específicas (rata)
P-E	Penicilina-Estreptomicina
PMS	gonadotropina de suero de yegua preñada
PVP	Polivinilpirrolidona
Ra	movilidad electroforética relativa a la albúmina
Rf	movilidad electroforética relativa al frente
RNA	ácido ribonucleico
SCN	suero de conejo normal
SFB	suero fetal bovino
SBIT	inhibidor de tripsina de poroto de soja



T	Testosterona
T <sub>1</sub>	cola proximal del epidídimo
T <sub>2</sub>	cola distal del epidídimo
TCA	ácido tricloroacético
UI	unidad internacional

## INTRODUCCION

La interacción de un espermatozoide y un ovocito marca, en alguna medida, una línea divisoria entre la vida y la muerte. Si estas dos células interactúan con éxito, teniendo lugar lo que se denomina "fertilización", sus núcleos se combinarán y comenzará el desarrollo de un nuevo individuo; pero si esto no ocurre ambas células morirán al cabo de pocas horas.

Esto explica entonces claramente, el gran gasto de energía tanto fisiológica como comportamental, que los organismos vivientes destinan al sólo fin de asegurar el encuentro entre sus gametas.

Pero si bien la unión de estas dos células significa un hecho crítico para las especies, no lo es menos para los científicos, quienes han encontrado en su estudio la posibilidad de descifrar muchos de los misterios de la biología celular.

Es así que gracias a las intensas investigaciones acerca de este evento a nivel molecular, hoy no sólo contamos con nuevos elementos de control de la fertilidad sino que comprendemos cada vez más otros fenómenos celulares tales como los que ocurren en la célula cancerosa.

Básicamente el proceso de fertilización comprende tres etapas fundamentales.

1) Reconocimiento del ovocito por el espermatozoide.

2) Regulación, por parte del ovocito, de la entrada del espermatozoide, de modo tal que la fertilización ocurra entre gametas homólogas y con un sólo espermatozoide por ovocito (base de la continuidad y diversidad de especie).

3) Activación del "adormecido" metabolismo del ovocito, permitiendo el comienzo de la división celular y el desarrollo embrionario.

Para que esta serie de pasos se lleven a cabo, se hace evidente que tanto el espermatozoide como el ovocito deben ser células altamente especializadas.

El conjunto de cambios que sufre un espermatozoide durante su tránsito por el epidídimo, y que en todos los mamíferos estudiados, resulta en la adquisición de capacidad fertilizante, constituye el denominado "proceso de maduración".

El objetivo de este trabajo consiste precisamente en estudiar la posible participación de los factores epididimarios en el proceso por el cual un espermatozoide inmaduro se convierte en una célula capaz de alcanzar, reconocer y finalmente fertilizar a un ovocito.

## Estructura del espermatozoide

El espermatozoide es una célula haploide cuya estructura y composición molecular están "diseñadas" para cumplir con una trascendente misión: la de atravesar las distintas envolturas que rodean a un ovocito permitiendo así la fusión entre las respectivas membranas plasmáticas y con ello la transmisión de su propio material genético a la gameta materna.

La mayor parte de los conocimientos acerca de la estructura fina de un espermatozoide se debe a la microscopía electrónica (1, 2).

Mediante el uso de esta técnica se han podido observar espermatozoides provenientes de diversos mamíferos, cuya similitud estructural nos permite hacer ciertas generalizaciones.

Describiremos entonces a un espermatozoide, haciendo referencia a las correlaciones existentes entre estructura, sustratos bioquímicos y funciones de esta célula, dado que la capacidad fertilizante está determinada por su normalidad químico-estructural y metabólica.

En el "típico" espermatozoide de mamífero se pueden distinguir dos segmentos bien diferenciados: (Figura 1).

A) la cabeza, encargada del aporte del material genético y

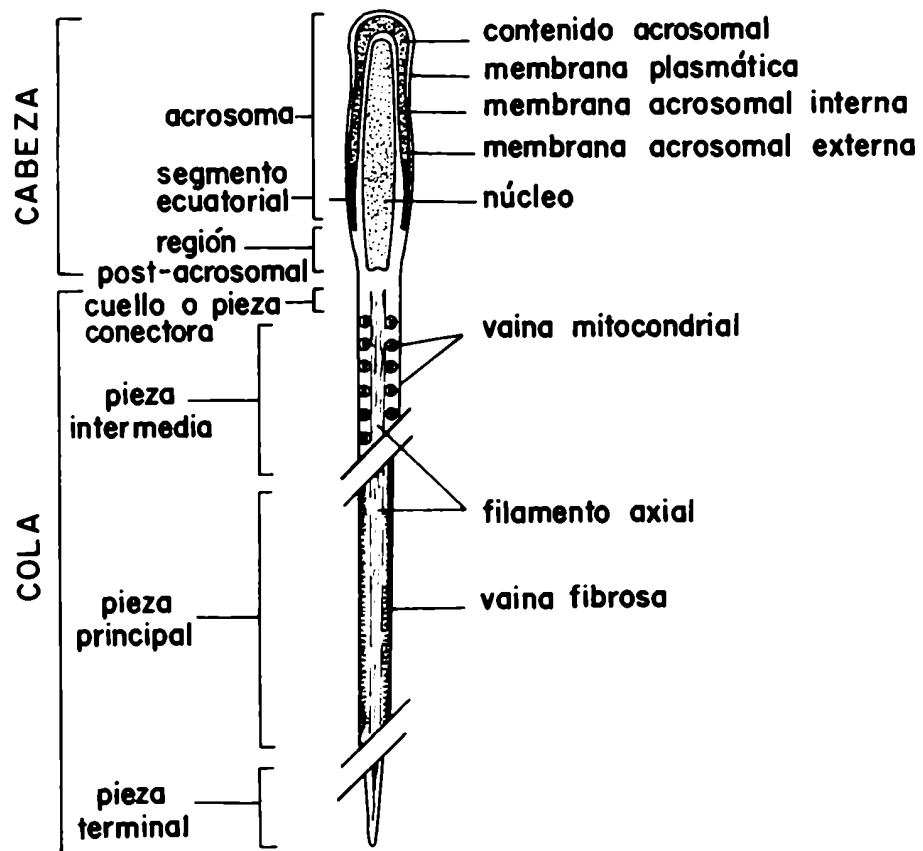


Figura 1: Representación esquemática de la organización general de un espermatozoide de mamífero.

B) la cola, encargada de la actividad metabólica y la motilidad.

Cada uno de ellos puede a su vez dividirse en subregiones que se caracterizan por tener diferentes organelas, así como una organización de membrana y composición bioquímica específicas (3, 4)

#### A) Cabeza

La cabeza de un espermatozoide está formada por el núcleo y el acrosoma.

núcleo: el núcleo esférico de una espermátide, se vuelve elongado en un espermatozoide, condensándose la cromatina en el polo posterior.

Este polo se continúa luego con la cola, mientras que el polo anterior está cubierto por el acrosoma.

El nucleolo es menos visible que en la espermátide joven y se lo observa en forma de gránulos oscuros cercanos a la membrana nuclear.

Esta membrana derivada del retículo endoplasmático está constituida por dos láminas y un espacio interlaminal. La lámina interna experimenta dos engrosamientos, uno anterior convexo en la zona cubierta por el acrosoma, y otro posterior cóncavo llamado placa base por donde se unen la cabeza y la cola del espermatozoide.

acrosoma: es una especie de casquete que cubre el polo anterior del núcleo y que deriva del complejo de Golgi de la espermátide.

Aparentemente al iniciarse la espermiogénesis, aparecen en el aparato de Golgi unas vesículas conteniendo los llamados gránulos preacrosómicos los cuales se fusionan entre sí para formar una única vesícula: la vesícula acrosómica o acrosoma.

En un estadio posterior la membrana que rodea la vesícula aumenta su área de adherencia a la membrana nuclear, llegando a cubrir los dos tercios anteriores del núcleo.

Entre la membrana externa del acrosoma y la membrana plasmática, existen vesículas con un contenido rico en enzimas hidrolíticas, mientras que por su parte el acrosoma en sí, contiene glicoproteínas y enzimas proteolíticas que juegan un importante papel en la llegada del espermatozoide a la membrana plasmática del ovocito.

El borde distal del acrosoma se denomina segmento ecuatorial y al parecer también posee enzimas proteolíticas.

Siguiendo al segmento ecuatorial, se encuentra la región post-acrosomal, zona por la cual se fusionaría la membrana plasmática del espermatozoide con la membrana vitelina del ovocito.

#### B) Cola

En la cola del espermatozoide podemos distinguir cuatro seg

mentos:  cuello,  pieza intermedia,  pieza principal y  pieza terminal.

cuello: es una zona comprendida entre la placa base (engrosamiento posterior de la membrana nuclear) y la pieza intermedia.

En esta región se encuentran un par de centriolos formando un ángulo de 90° entre sí. Uno de ellos, el centriolo distal, dará origen al axonema que recorre toda la cola, rodeado de 9 fibras externas sólo a lo largo de la pieza intermedia y principal.

pieza intermedia: esta región se caracteriza por tener un gran número de mitocondrias dispuestas en forma helicoidal, estructura a la que se denomina "vaina mitocondrial".

Recordemos que las mitocondrias contienen las enzimas y coenzimas del ciclo de Krebs, que constituyen la vía común del metabolismo de hidratos de carbono, lípidos y proteínas, almacenándose la energía producida por estas reacciones, en forma de ATP.

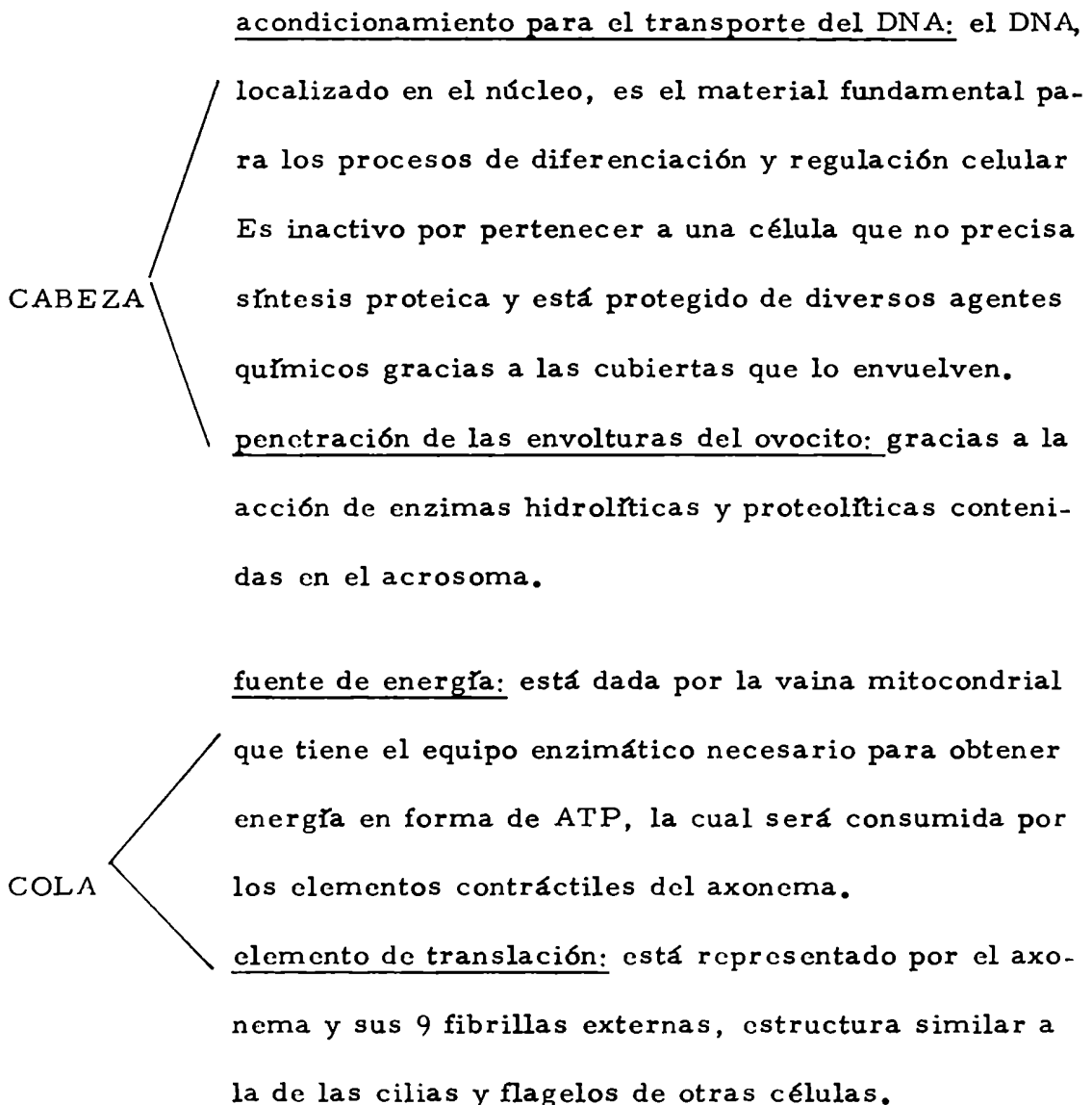
pieza principal: por su interior, al igual que ocurre con la pieza media, se encuentra el axonema rodeado de 9 fibrillas externas. En este segmento la vaina mitocondrial está sustituida por una "vaina fibrosa".

pieza terminal: tanto la vaina fibrosa como las fibras exteriores, desaparecen en un punto que marca el comienzo de la pieza terminal, la



cual está constituida por un axonema desorganizado y cubierto por la membrana celular que rodea al espermatozoide en su totalidad.

Para finalizar esta descripción, resumiremos la importancia que tiene cada estructura mencionada en relación con las principales funciones del espermatozoide.



Veamos ahora como participan cada uno de los órganos del tracto reproductor masculino, a lo largo de la vida de un espermatozoide, desde su producción hasta su eyaculación.

### Aparato genital masculino.

Esencialmente el sistema reproductor masculino está diseñado para producir espermatozoides maduros, almacenarlos hasta que sean necesarios, y descargarlos en la hembra formando parte de un fluido conveniente que les permita ascender por el tracto femenino.

Para cumplir con estas funciones el sistema reproductor consta de un sitio de producción de espermatozoides: los testículos, de un órgano de maduración, almacenamiento y transporte: el epidídimo y el vas deferens y de un grupo de glándulas accesorias que contribuyen a formar el plasma seminal y la porción fluida del eyaculado: vesículas seminales, próstata y glándulas bulbouretrales o de Cowper.

La Figura 2 muestra un diagrama generalizado del aparato reproductor masculino de un mamífero, incluyendo también la dirección del flujo de los espermatozoides y del fluido.

En la mayoría de los mamíferos, el testículo se encuentra ubicado en el escroto, cubierto por una cápsula de tejido conectivo: la túnica albugínea. Su parénquima consta de un compartimiento interno,

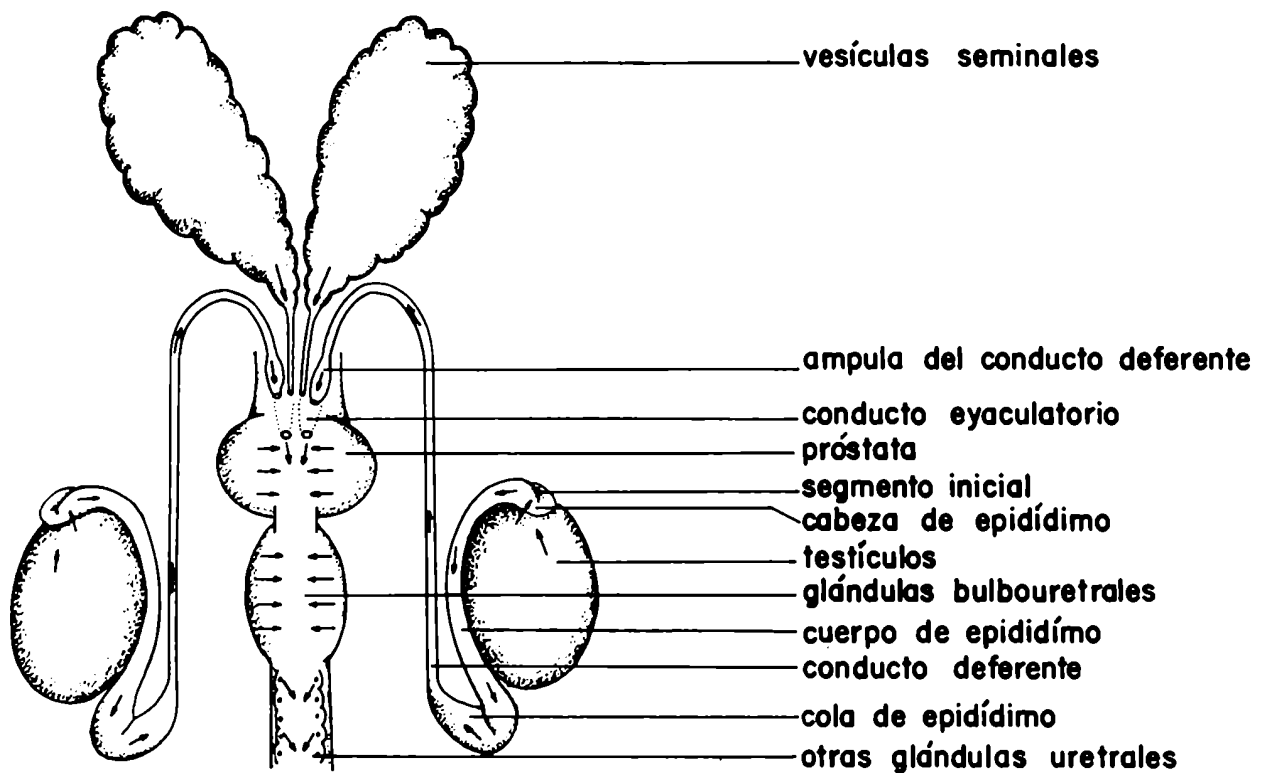


Figura 2: Diagrama generalizado del tracto reproductivo masculino de mamíferos. Las flechas indican la dirección del flujo de espermatozoides y del fluido.

no vascularizado, los túbulos seminíferos, donde se producen los espermatozoides como resultado de un complejo proceso citológico, "la espermatogénesis", por el cual una célula inmadura y simple, la espermatogonia, se convierte en un espermatozoide altamente diferenciado.

El otro compartimento, esta vez muy irrigado, lo constituye el tejido intersticial que rodea los túbulos seminíferos y que contiene a las células de Leydig, cuya función es la producción de hormonas androgénicas.

El testículo además de los espermatozoides, produce el fluido testicular que baña las células germinales. Este fluido es rico en K+, ácido ascórbico e inositol, conteniendo también altas cantidades de ácido glutámico y aspártico.

Los espermatozoides formados en los túbulos seminíferos son llevados en una suspensión diluída, a través de unos túbulos pequeños, los túbulos rectos, que convergen hacia la rete testis; ésta forma una trama de cavidades vasculares y canales comunicantes de paredes finas que emergen del testículo. En este punto se encuentra una válvula que impide el retorno del fluido a los túbulos seminíferos.

De la rete testis sale una serie de pequeños conductos, rectilíneos primero y arrollados sobre sí mismos después, los conductos

ferentes, que luego de un tortuoso camino conducen a los espermatozoides y al fluido testicular, hacia el epidídimo.

Este órgano, estrechamente unido a la cara externa del testículo, está formado por un único y largo conducto enrollado sobre sí en forma compacta.

Pueden distinguirse en él tres grandes zonas o segmentos: cabeza, cuerpo y cola, los cuales histológica, morfológica y funcionalmente resultan diferentes.

Además de un rol de transporte y almacenamiento, el epidídimo interviene activamente en el proceso de maduración de los espermatozoides, al que describiremos en detalle más adelante.

El epidídimo se continúa luego en el conducto deferente, que ya no es más contorneado como los conductos hasta ahora descritos, sino recto, delgado y de paredes musculares gruesas. En su porción inicial sigue un trayecto paralelo al epidídimo para luego entrar a formar parte del cordón espermático. Su porción terminal muy dilatada se conoce con el nombre de ampulla diferencial y representa un reservorio de espermatozoides.

Restan mencionar entonces las glándulas accesorias cuya secreción es recibida por los espermatozoides en el momento de la eyaculación.

Esta secreción, junto al fluido testicular y epididimario constituyen el llamado plasma seminal, el que además de aportar los productos necesarios para la actividad metabólica de los espermatozoides, posee una serie de funciones esenciales para el transporte y maduración de los mismos.

Los espermatozoides, (componente celular), y el plasma seminal (componente plasmática) forman en conjunto el eyaculado. Las vesículas seminales son dos sacos alargados que se unen por un estrecho cuello con el conducto deferente para formar el conducto eyaculador.

La secreción de las vesículas seminales representa el 60% del volumen total del eyaculado caracterizándose por su notable poder reductor. Los componentes más importantes por su significación metabólica son, la fructosa, el ácido ascórbico, las prostaglandinas y el K<sup>+</sup>.

La próstata es una glándula firme y compacta, ubicada inmediatamente por debajo de la vejiga, que descarga su secreción a la uretra prostática a través de una serie de pequeños túbulos. La secreción prostática representa aproximadamente el 30 % del eyaculado, es ácida (pH: 5.4) y contiene Zinc, ácido cítrico y fosfatasas ácidas como elementos más importantes, además de cloruros, colesterol, aminoáci-

dos y fosfolípidos.

Las glándulas bulbouretrales son un par de glándulas túbulo alveolares, que vierten su secreción mucoidea directamente en la uretra membranosa.

Además de ser importante en volumen, su secreción es rica en albúmina, a la que se le atribuye un mero papel lubricante. Contiene también mucopolisacáridos compuestos de galactosa, galactosamina, ácido galacturónico, ácido siálico y metil-pentosa.

Cabe aclarar que todos estos órganos y glándulas comparten una sensibilidad a los esteroides sexuales, dependiendo de los andrógenos para la diferenciación y mantenimiento de sus propiedades estructurales y funcionales. De ahí se deduce la enorme importancia de la función endócrina del testículo.

Puesto que el punto principal de este trabajo consiste en el estudio del proceso de maduración que sufren los espermatozoides durante su tránsito por el epidídimo, describiremos más detalladamente las propiedades histológicas y fisiológicas que caracterizan a éste órgano.

#### Histología y fisiología del epidídimo.

Uno de los objetivos de muchos investigadores (5, 6, 7, 8) ha sido el establecimiento de una apropiada división del epidídimo, que

se corresponda con las variaciones estructurales y funcionales observadas a lo largo de este órgano.

Ya es un hecho bien claro, que los términos: cabeza, cuerpo y cola, utilizados para designar las tres regiones anatómicas del epidídimo, no necesariamente se refieren a la misma región en las diferentes especies.

Glover y Nicander (7), basándose en criterios filogenéticos y fisiológicos, propusieron tres regiones funcionales a las que llamaron: segmentos inicial, intermedio y terminal. Sin embargo, estas regiones presentan diferente longitud según la especie y no tienen en cuenta la diversidad celular encontrada en el epitelio epididimario.

Utilizando entonces un criterio histológico para la clasificación de las diferentes zonas del epidídimo, se han podido describir al menos cuatro zonas en el ratón (9), cinco en el cobayo y el hamster (6, 10), seis en la rata, carnero y toro (11, 12) y hasta ocho en el conejo y en el hombre (13, 14).

De todos modos, para simplificar la descripción histológica general que haremos a continuación, consideraremos al epidídimo dividido esquemáticamente en cuatro zonas principales: segmento inicial, cabeza, cuerpo y cola.

El lumen de los túbulos del segmento inicial está tapizado por un alto epitelio pseudoestratificado constituido por células principales, basales y apicales (11).



Distalmente al segmento inicial, las células apicales comienzan a desaparecer, encontrándose sólo células principales y basales en la cabeza y cuerpo epididimarios. Este tipo de epitelio se mantiene bastante uniforme a lo largo de todo el epidídimo excepto por algunas variaciones en la altura celular y otras características citológicas, que podrían indicar modificaciones locales de la actividad metabólica.

Es así que la luz tubular es menor en los segmentos proximales al testículo, donde la velocidad de absorción de componentes del fluido es elevada, aumentando en los segmentos siguientes, donde la secreción proteica es importante y la reabsorción de agua disminuye (15).

En el segmento más distal, la cola epididimaria, aparece un cuarto tipo celular: las células claras, y mientras la altura del epitelio es mucho menor que en otras regiones, el diámetro luminal aumenta bruscamente, confiriéndole a esta región una gran capacidad para el almacenamiento de espermatozoides.

Las células principales están presentes a lo largo de todo el epidídimo, presentando características citológicas que varían de acuerdo a la región del órgano (16).

Son células columnares altas en el segmento inicial y cabe

za, transformándose progresivamente en células de menor altura en el cuerpo y cola epididimarias.

En la membrana apical pueden observarse numerosas microvellosidades (estereocilias), de variados tipos y longitudes, como así también vesículas pinocitóticas ubicadas en la base de las mismas.

Poseen un núcleo basal, rico en cromatina y variable en cuanto a forma y tamaño a lo largo del epidídimo, rodeado generalmente por un retículo endoplasmático rugoso muy extenso, que ocupa gran parte del citoplasma celular.

El rasgo más sobresaliente de estas células es su altamente desarrollado aparato de Golgi (compuesto de cisternas paralelas de membranas lisas), lo cual sumado a las características mencionadas anteriormente, nos estarían indicando la alta actividad secretoria de este tipo celular.

En el elongado citoplasma supranuclear se encuentran además, mitocondrias uniformemente distribuídas y numerosos gránulos de secreción, lisosomas y cuerpos multivesiculares.

Las células basales, apoyadas sobre la membrana basal, se distribuyen esporádicamente a lo largo del conducto epididimario y a diferencia de las células principales, presentan un citoplasma con pocas organelas e inclusiones celulares. La mayor parte de las células basa-

les interdigitan de manera compleja con las células principales, presumiblemente estabilizando el epitelio.

Las células apicales se encuentran casi exclusivamente en el segmento inicial del epidídimo, distribuyéndose a lo largo de la superficie luminal del epitelio. Si bien presentan varias características de las células principales adyacentes, existen diferencias cualitativas que las distinguen.

El citoplasma contiene una menor cantidad de organelas (e incluso con formas algo diferentes a las de las células principales) algunas mitocondrias menos uniformes en su forma y aparentemente más largas, y sólo unos pocos sáculos cortos de retículo endoplasmático granular.

Las microvellosidades que se observan raramente en la superficie luminal son también menos desarrolladas que en las principales.

Las células claras, denominadas así por presentar un citoplasma claro al microscopio óptico, se encuentran particularmente en el segmento terminal del epidídimo. El análisis ultraestructural de las mismas, reveló la presencia de vacuolas y lisosomas en la zona apical y de acúmulos de glicolípidos (17) o gotas lipídicas en la base celular.

También poseen algunos sáculos de retículo endoplasmático

granular en su base, un aparato de Golgi pobremente desarrollado so  
bre el núcleo y algunas microvellosidades cortas en la superficie lu-  
minal.

A partir de los estudios histológicos y ultraestructurales  
descriptos, se hace evidente que el epitelio epididimario no es el que  
se esperaría encontrar para un órgano cuya única función fuese la del  
transporte y/o almacenamiento pasivo de los espermatozoides.

De hecho se ha demostrado que el epidídimo interviene ac-  
tivamente en el proceso de maduración de los espermatozoides, a trau  
vés de las funciones absorptivas y secretorias de su epitelio.

Se ha estimado que en algunas especies, más del 90% del  
fluido que sale del testículo, se reabsorbe en los conductos eferentes  
y regiones proximales del epidídimo (18). Esto se debe a la demostra  
da capacidad del epitelio de transferir líquido desde el lumen hacia el  
intersticio y de absorber y digerir el material particulado o macromo  
lecular.

Es posible que estos dos procesos, mediados por mecanis-  
mos de micropinocitosis, actúen en forma complementaria de modo  
tal que la célula, al ingerir el plasma epididimario, absorbería no só  
lo agua e iones sino también macromoléculas de diversos tipos. Mientr  
as el agua y los iones pueden ser fácilmente eliminados de la célula,

las macromoléculas serían secuestradas y digeridas.

También existen pruebas de que el epitelio epididimario es capaz de sintetizar determinados compuestos, algunos de los cuales son secretados al lumen tubular:

a) glicerofosforilcolina (GPC): Dawson y colaboradores (19), fueron los primeros en observar que el epidídimo contenía grandes cantidades de GPC.

Posteriormente Scott y colaboradores (20), a través de la incorporación de  $^{32}\text{P}$  in vivo e in vitro, demostraron que dicho GPC era efectivamente sintetizada en el órgano y no provenía de la ruptura de fosfolípidos del espermatozoide (21).

Si bien aún se desconoce el rol fisiológico de la GPC en el semen, se plantea la posibilidad de que esta sustancia tenga un efecto estabilizador sobre los espermatozoides e intervenga en el mantenimiento del equilibrio osmótico luminal a medida que se absorbe el NaCl (20).

La acumulación de este compuesto a lo largo del epidídimo, podría explicarse teniendo en cuenta la ausencia de una GPC-diesterasa en el órgano y la incapacidad de los espermatozoides de metabolizar la GPC exógena.

b) ácido siálico y glicoproteínas: dado que la mitad de los carbohidratos del fluido epididimario, (con reacción de orcinol positiva), pueden ser precipitados con ácido tricloroacético (TCA), se ha sugerido que éstos se encuentran unidos a proteínas.

Este hecho, sumado a la rápida incorporación de  $^3\text{H}$  galactosa o  $^3\text{H}$  fucosa al complejo de Golgi de las células epiteliales, y su posterior aparición en el lumen, permiten concluir que el epitelio epididimario es capaz de sintetizar y secretar glicoproteínas (22), produciendo aparentemente tanto la porción proteica como la de hidratos de carbono de las mismas (23).

Al respecto, se han identificado importantes cantidades de ácido siálico (grupo de azúcares unidos a proteínas, lípidos o polisacáridos) en el fluido luminal (24, 25, 26).

Aunque muchas de las proteínas antigénicas se encuentran unidas a esta entidad (27), hasta el momento no se han encontrado explicaciones satisfactorias sobre la función del ácido siálico en la expresión de las propiedades inmunológicas de esas glicoproteínas.

La identificación de glicoproteínas epididimarias específicas, como así también sus probables mecanismos de acción, se discutirán en detalle posteriormente.

c) carnitina: este compuesto, que en otros tejidos está involucrado en

el transporte de algunos ácidos grasos hacia las mitocondrias, se en cuenta también presente en altas concentraciones en el epidídimo (28).

Inicialmente se pensó que la carnitina se sintetizaba localmente, pero trabajos más recientes demostraron sólo su transporte y acumulación en el lumen del cuerpo y de la cola del epidídimo.

Su función en el plasma seminal aún no se conoce, pero el hecho de que los espermatozoides tengan una alta actividad de carnitina-acetil transferasa (28) sugiere su probable participación en el metabolismo energético de los espermatozoides almacenados en el epidídimo.

d) esteroides: aunque la mayor parte de la testosterona (T) y Dehidroepiandrosterona (DHEA) presentes en el epidídimo (29), provienen del fluido testicular, existen evidencias que sugieren que el epidídimo mismo es capaz de sintetizar esteroides in vitro (30).

Es así que algunos investigadores, mediante análisis bioquímicos e histológicos, demostraron la existencia de hidroxisteroides deshidrogenasas (enzimas esenciales en la síntesis de esteroides androgénicos) (31), mientras que otros grupos observaron la síntesis in vitro de colesterol, testosterona y DHEA, utilizando  $^{14}\text{C}$  acetato como precursor (32, 33, 34).

De todos modos, aún no hay evidencias de la síntesis in vivo

de esteroides, ni del significado fisiológico de esta probable actividad epididimaria.

Finalmente cabe aclarar que el epitelio epididimario es no toriamente sensible a los andrógenos, tal como lo demuestra la gran disminución de sus actividades absortivas y secretorias, observada luego de la hipofisectomía o castración del animal.

#### El epidídimo como órgano efector de andrógenos.

La dependencia del epidídimo por los andrógenos se pone de manifiesto utilizando el clásico esquema de castración y administración exógena de la hormona.

Es así que la castración produce una profunda atrofia del órgano (pérdida de peso, disminución del diámetro luminal, involución del epitelio)(35, 36, 37, 38) una alteración de la actividad secretoria (menor secreción de GPC (39, 40), ácido siálico (41, 42) y carnitina (43); menor actividad de fosfatasas alcalina y ácida (44) y 5  $\alpha$  reductasa (45)) y la pérdida de motilidad (5, 46) y capacidad fertilizante de los espermatozoides (47, 48, 49), mientras que la posterior administración de testosterona puede revertir parcial o totalmente estas alteraciones. A continuación resumiremos el mecanismo de acción de los andrógenos, cuya secuencia de eventos se esquematiza en la Figura 3.



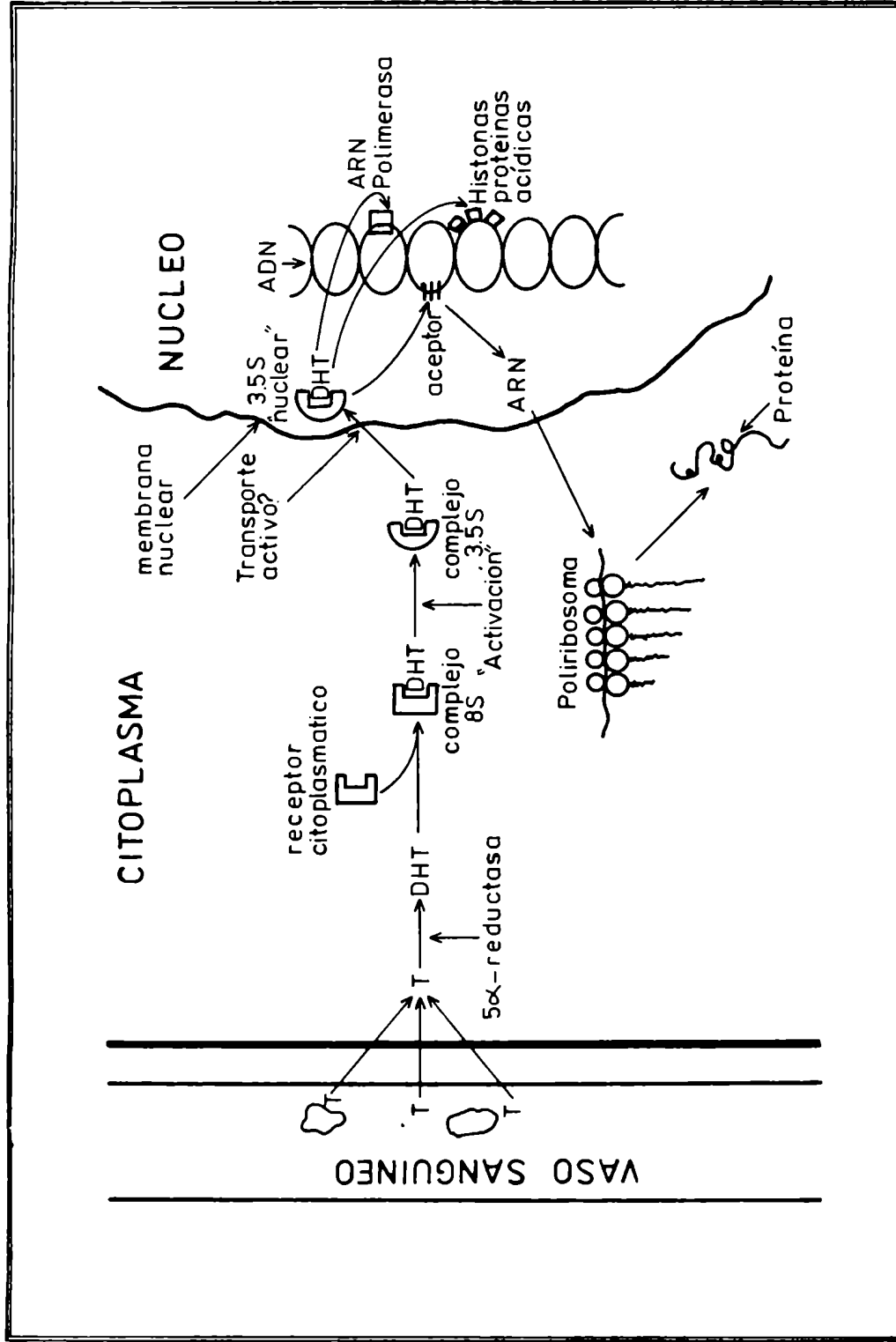


Figura 3: Esquema del mecanismo de acción de los andrógenos en los tejidos efectores.

8 S y 3.5 S representan los coeficientes de sedimentación de los complejos

hormona-receptor citoplasmático y activado o nuclear respectivamente.

La T sintetizada en el testículo, llega al epidídimo tanto por la vía sanguínea como por la vía canalicular, ésta última cuantitativamente más importante.

El fluido testicular, secretado por las células de Sertoli luego de la estimulación por FSH, contiene testosterona libre y también unida a una proteína ligadora de andrógenos, el ABP, que sería la responsable del transporte intratubular de los andrógenos.

En el torrente sanguíneo por su parte, la hormona viaja unida a globulinas transportadoras, llegando así a las glándulas sexuales anexas y a los tejidos efectores.

Si bien hay quienes sostienen que la entrada de hormonas a la célula ocurre a través de un transporte facilitado (50), con activa participación de una proteína de membrana (51), la teoría más aceptada actualmente sugiere la difusión libre de testosterona a través de la membrana plasmática y a favor de un gradiente de concentración (52).

No obstante ser la T el principal andrógeno secretado por el testículo de diversos mamíferos (53), está ampliamente demostrado que su metabolito reducido, la dihidrotestosterona (DHT) es la hormona fisiológicamente activa.

La metabolización de T a DHT se lleva a cabo en el cito -

plasma de las células blanco y está catalizada por la enzima NADPH: 5 $\alpha$  cetoesteroide reductasa (54), (ubicada principalmente en las fracciones microsomal y nuclear (55),) cuya actividad mostró ser también andrógeno-dependiente (45).

La magnitud de esta transformación es tal que la relación T/DHT que es de 10:1 a la salida del testículo (56) pasa a ser 1 :6 en el epidídimo (57).

En este órgano actúan además las enzimas 3 $\alpha$  y 3 $\beta$  ol deshidrogenasas ( que a diferencia de la 5 $\alpha$  reductasa muestran una actividad concentrada en la fracción soluble del citoplasma (58)) que llevan reversiblemente la DHT hacia la formación de 3 $\alpha$  y 3 $\beta$  androstan dioles (dioles), utilizando también NADPH como cofactor.

La DHT se une entonces con alta afinidad y no covalentemente (59), a una proteína citoplasmática, "el receptor", dando lugar al complejo hormona-receptor (H-R), cuya presencia en el epidídimo ha sido demostrada por diversos grupos de investigación (60, 61, 62, 63, 64).

Luego de su activación, el complejo se transloca al núcleo donde se une en forma específica a los sitios aceptores de la cromatina (65, 66), y permanece retenido por un tiempo variable. El complejo induce entonces la transcripción del material genético específico

y la activación de la maquinaria enzimática necesaria (67).

Finalmente el complejo se disocia de los sitios aceptores y el receptor retorna al compartimento citoplasmático mediante el proceso de reciclado (68).

A través de este mecanismo los andrógenos regulan la función epididimaria cuya principal resultante es sin lugar a dudas, "la maduración de los espermatozoides".

#### Proceso de maduración del espermatozoide.

Antiguamente se consideraba al epidídimo como un simple conducto de paso de espermatozoides desde el testículo al conducto eyaculador.

Esta hipótesis continuó sosteniéndose hasta que llamó notablemente la atención el hecho de que un espermatozoide proveniente del testículo, si bien constituía una célula altamente especializada, era incapaz de fertilizar a un ovocito sin antes haber transitado a lo largo del epidídimo.

Más aún, muchos investigadores dedicados al estudio de la función epididimaria habían observado diferencias en las características de espermatozoides de distintas regiones del órgano, por lo cual finalmente se concluyó que debían ocurrir fenómenos de suma impor-

tancia sobre un espermatozoide durante su tránsito por el epidídimo, que resultaran en la adquisición de capacidad fertilizante.

Gracias a los avances que se han hecho, principalmente debidos a la introducción de innovaciones metodológicas, actualmente es bien conocido que el pasaje de un espermatozoide por el epidídimo, está acompañado por una serie de cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos que en conjunto constituyen el denominado "proceso de maduración."

Se ha podido demostrar que la maduración de un espermatozoide, al igual que otras funciones epididimarias, también depende de un adecuado aporte de andrógenos. (69, 47, 70).

Al no haberse encontrado receptores androgénicos en los mismos espermatozoides (71) se ha sugerido que los andrógenos afectarían a los mismos en forma indirecta a través de su acción sobre el tejido epididimario. (72)

La hormona induciría entonces la síntesis de productos secretorios, los cuales liberados al lumen, modificarían al medio que rodea a los espermatozoides favoreciendo su maduración.

Por otro lado, estos productos secretorios podrían interactuar directamente con las gametas, alterando sus propiedades de superficie o produciendo otros cambios que condujeran a la adquisición

de capacidad fertilizante.

Básicamente los diferentes cambios que ocurren durante la maduración pueden dividirse en cinco grandes grupos:

- 1.- CAMBIOS EN LA HABILIDAD FERTILIZANTE
- 2.- CAMBIOS EN LA MOTILIDAD
- 3.- CAMBIOS METABOLICOS
- 4.- CAMBIOS ESTRUCTURALES
- 5.- CAMBIOS A NIVEL DE SUPERFICIE

A continuación describiremos brevemente en qué consisten cada uno de ellos, cómo así también de qué manera el epidídimo resulta ser relevante para la función última de un espermatozoide: "la fertilización".

1) Cambios en la habilidad fertilizante.

La suposición de los primeros investigadores acerca de una maduración funcional de los espermatozoides en el epidídimo de la mayoría de los mamíferos, fueron confirmadas por Young en 1931 (73), quién observó un aumento en el porcentaje de hembras preñadas luego de la inseminación de espermatozoides de cola distal (68%) respecto del obtenido con espermatozoides de cola proximal (33%).

Estos resultados obtenidos en cobayo se extendieron luego al conejo (74, 75), a la rata (76) y al hamster (77), sugiriendo entonces que la adquisición de habilidad fertilizante ocurría gradualmente a medida que el espermatozoide recorría el epidídimo.

Posteriormente se demostró que dicha adquisición se producía en un segmento determinado del órgano, donde algunos espermatozoides estaban maduros para fertilizar al ovocito, si bien la mayoría de los mismos se encontraban maduros cuando alcanzaban recién las regiones más distales.

Sin embargo, este "segmento de transición" resultó ser diferente según la especie estudiada. Es así que en el conejo y en el carnero ya se encuentran espermatozoides fértiles en el cuerpo proximal, (74, 75, 78), mientras que en la rata (47), el hamster (77) y aparentemente el hombre (79), los primeros espermatozoides con capacidad fertilizante, se hallan recién en la unión entre el cuerpo distal y la cola proximal.

De todos modos la maduración de un espermatozoide no es un fenómeno relacionado sólo con la capacidad de penetrar a un ovocito. Orgebin-Crist (80, 81, 82) demostró que los ovocitos fertilizados por espermatozoides de la región proximal (tanto del cuerpo como de la cola del epidídimo) eran menos capaces de desarrollarse normal-

mente durante el período de preimplantación que aquellos ovocitos fertilizados por espermatozoides eyaculados. Estos resultados fueron también hallados por otros autores (83, 84) por lo cual puede concluirse que el proceso de maduración de un espermatozoide continúa aún luego de haber adquirido la capacidad fertilizante.

Young en 1931 (73), encontró un pequeño aumento en el porcentaje de hembras de cobayo preñadas, cuando éstas eran inseminadas con los espermatozoides de la cola proximal de un epidídimo cuyos vas deferens habían permanecido ligados durante 25 días.

Sin embargo, en los últimos años se ha hecho evidente que la sóla retención de los espermatozoides no es condición suficiente para que se desarrollen los diversos cambios que acompañan al proceso de maduración.

Es así que cuando se impide el descenso de espermatozoides de conejo mediante ligaduras del conducto, los espermatozoides de cabeza proximal adquieren motilidad pero no capacidad fertilizante, aún luego de haber estado retenidos en esta región durante un período de 12 días, que supera el tiempo empleado para el normal tránsito de un espermatozoide a lo largo de todo el epidídimo (75).

Del mismo modo, en el hamster, la retención de espermatozoides en las regiones proximales del órgano no resulta en la adqui



sición de habilidad fertilizante por parte de los mismos (77, 85).

Parecería entonces, que al menos en estas dos especies, los espermatozoides necesitarían exponerse al entorno de una región determinada del epidídimo, para poder desarrollar la capacidad de fertilizar al ovocito, atribuyéndose actualmente esta propiedad a la acción específica de las secreciones epididimarias.

## 2) Cambios en la motilidad.

La motilidad de los espermatozoides es una propiedad que sólo se expresa cuando éstos se ponen en contacto con las secreciones de glándulas accesorias en el momento de la eyaculación, o bien al ser diluídos en una solución buffer.

Sin embargo es bien sabido que los espermatozoides provenientes de testículo son incapaces de mostrar motilidad, adquiriendo recién esta capacidad al transitar por el conducto epididimario (86).

Hammar en 1897 (87) y luego Tournade en 1913 (88), observaron inclusive que el perfil de motilidad de espermatozoides epididimarios se modifica tanto cuantitativa como cualitativamente a medida que éstos descienden por el epidídimo.

Es así que los espermatozoides de cabeza se mueven débilmente in situ y en forma circular, mientras que los espermatozoides

de la región caudal ya pueden desplazarse vigorosamente con el característico movimiento progresivo y direccional, constituyendo indudablemente la motilidad el cambio más notorio que sufre un espermatozoide durante el proceso de maduración.

Aunque no se conocen exactamente cuáles son los mecanismos involucrados en la adquisición de motilidad, ni en la transición del movimiento circular al progresivo, son varios los parámetros que podrían influir:

a) cambios en la estructura flagelar: los estudios de Bedford y colaboradores (86, 89, 90) demuestran claramente que durante el desarrollo de la motilidad en el epidídimo, existen cambios en el estado de oxidación de los grupos sulfidrilos (SH) del espermatozoide .

El consecuente aumento en el contenido de puentes disulfuro (S-S), junto a la fosforilación de microtúbulos (91) llevaría a la estabilización de las estructuras celulares (pieza intermedia, membrana mitocondrial externa y cubierta fibrosa de la pieza principal) responsables de modelar la forma y amplitud del movimiento flagelar.

b) cambios bioquímicos: Hoskins y colaboradores trabajando en conejo (92, 93) sugirieron que los cambios en la motilidad de un espermatozoide

tozoide podrían estar relacionados con el contenido intracelular de AMP<sub>c</sub>. Esta suposición se basa en que los niveles de AMP<sub>c</sub> del espermatozoide prácticamente se duplican durante su pasaje por el epidídimo, mientras que en forma paralela existe una disminución de la actividad de la fosfodiesterasa, enzima encargada de la degradación de AMP<sub>c</sub> del fluido epididimario.

Más aún, se ha podido inducir in vitro mediante el agregado de inhibidores de fosfodiesterasa, un aumento en la motilidad de espermatozoides de cabeza de cobayo (94) y rata (95), aunque sin llegar a mostrar el movimiento progresivo característico del espermatozoide maduro.

c) efecto de factores extrínsecos: Lindhomer trabajando en el hombre (96) y Hoskins en carnero (92) observaron que el agregado simultáneo de un inhibidor de fosfodiesterasa y de pequeñas cantidades de plasma seminal a una suspensión de espermatozoides de cabeza era capaz de inducir, al cabo de diez minutos, motilidad progresiva y direccional en casi el 40 % de los espermatozoides.

Restaba no obstante saber cuál era precisamente el factor responsable de esta actividad del plasma seminal, como así también

de dónde procedía y de qué manera actuaba.

A raíz de estos interrogantes Hoskins encaró una purificación y caracterización parcial del factor al que denominó FMP, concluyendo que el mismo era una glicoproteína estable al calor, con un peso molecular aparente de 37000 para su forma monomérica (97).

Debemos aclarar no obstante que los espermatozoides testiculares no responden a la acción de este factor, lo cual implica otra diferencia adicional entre el espermatozoide testicular y el espermatozoide epididimario.

Young en 1929 (98) demostró que la motilidad de espermatozoides de cobayo, retenidos en cabeza por una simple ligadura, aumentaba considerablemente respecto a la de espermatozoides de cabeza provenientes de un epidídimo no ligado, por lo cual sugirió que la adquisición de motilidad era un proceso de naturaleza intrínseca, dependiente del tiempo, que comenzaba en el testículo y se completaba en el túbulo epididimario.

En los últimos 40 años se han hecho muchos intentos usando la técnica de ligaduras, para determinar si los aumentos de motilidad de espermatozoides retenidos eran debidos a factores intrínsecos o extrínsecos al espermatozoide.

Es así como algunos autores trabajando con otras especies coincidieron con Young (77, 99, 100, 101, 102), mientras que otros (103) no encontraron ninguna diferencia de movimiento entre espermatozoides de epidídimos ligados y epidídimos control.

Sin embargo, aún en los casos en que existía aumento en la motilidad, no pudo observarse nunca el desarrollo del movimiento unidireccional y progresivo.

Actualmente se piensa que un factor del medio externo es el responsable de convertir el movimiento flagelar en el clásico movimiento progresivo, postulándose como firme candidata la glicoproteína purificada por Hoskins (FMP).

Aunque no se conoce su procedencia, la gran concentración de FMP encontrada en el fluido de la cola del epidídimo hace pensar en su origen epididimario, por lo cual podría concluirse que esta glicoproteína interactuaría con el espermatozoide otorgándole la capacidad de movimiento direccional.

### 3) cambios metabólicos:

La dificultad de obtener preparaciones de espermatozoides de suficiente cantidad y pureza, limitó durante varios años el estudio de los cambios metabólicos que acompañan al tránsito de un esperma-

tozoide por el epidídimo.

Sin embargo el posterior desarrollo de una técnica para la recolección de espermatozoides de rete testis (104) ha permitido la comparación de varias características bioquímicas entre espermatozoides con diferente grado de maduración.

Gracias a ello actualmente podemos afirmar que el metabolismo de un espermatozoide testicular difiere totalmente del de un espermatozoide maduro (105).

Durante el tránsito de un espermatozoide por el epidídimo aumentan la glicólisis y la respiración (medidas a través del consumo de oxígeno), mientras que disminuye la actividad biosintética (106).

Se ha podido observar que los espermatozoides testiculares convierten una mayor proporción de glucosa en  $\text{CO}_2$  y una menor en lactato, respecto de espermatozoides de cola de epidídimo (107), como así también que espermatozoides inmaduros son capaces de formar apreciables cantidades de aminoácidos a partir de glucosa, no pudiendo observarse lo mismo para el caso de espermatozoides eyaculados (104, 107, 108).

Contrariamente, la capacidad de síntesis de fosfolípidos, medida por la incorporación de glucosa a lípidos, es mayor en el espermatozoide inmaduro que en el eyaculado (106, 109).

Por su parte la capacidad de síntesis proteica, ha sido demostrada a través de la incorporación de aminoácidos marcados a las proteínas de espermatozoides (110), existiendo inclusive evidencias de que la maquinaria sintética estaría localizada en las mitocondrias (111); de todos modos la cantidad de proteínas sintetizadas por los espermatozoides es muy pequeña.

Por lo tanto se cree que las modificaciones que en este aspecto ocurren durante la maduración, estarían asociadas a cambios en las macromoléculas (posteriores a la traducción), como fosforilación, formación de puentes disulfuro, o glicosilación, más que a la síntesis de nuevos componentes.

El análisis completo del fluido luminal del epidídimo permitió establecer una diferente composición del mismo para los sucesivos segmentos (108, 112, 113, 114).

Es así que se ha observado una serie de modificaciones, en sentido céfalo-caudal, entre las cuales pueden mencionarse una importante reabsorción del fluido que resultan en un aumento de 20 veces en la concentración de los espermatozoides, una disminución apreciable del pH (113) y de la osmolaridad (115) y una variación de la concentración iónica, con caída del cociente  $Na^+/K^+$  (113, 116, 117), reducción de cloruros ( $Cl^-$ ) y aumento de fosfatos ( $PO_4^{-3}$ ). (114)

Por otro lado, el fluido epididimario contiene un cierto número de sustancias tales como ácido láctico, inositol, GPC, carnitina, glutamato, ácidos grasos de cadena larga, etc. (39) que el espermatozoide podría utilizar como sustratos metabólicos.

Si bien hasta el momento no se conoce de qué manera estas sustancias y/o los diferentes cambios antes mencionados, podrían afectar al proceso de maduración in vivo, existen evidencias de que el metabolismo de los espermatozoides puede ser modificado in vitro por la acción del fluido epididimario o de los diversos componentes encontrados en el mismo. (118)

El agregado de fluido de rete testis (RTF) o de fluido de la cola del epidídimo (CEF) a suspensiones de espermatozoides testiculares y epididimarios, logra aumentar la entrada de oxígeno y cambiar el perfil de degradación de la glucosa.

Las altas concentraciones de carnitina presentes en el fluido epididimario han resultado tener efectos contradictorios sobre la oxidación de palmitato. Mientras algunos autores observaron que la carnitina aumenta la velocidad de oxidación en espermatozoides bovinos (119), otros no encontraron ningún efecto (120) o inclusive observaron una disminución. (121)



Es probable que estas discrepancias se deban a los diferentes estados de maduración que presentaran los espermatozoides o a los distintos protocolos experimentales empleados en cada caso.

La presencia de esteroides en los fluidos del tracto reproductor (29, 122) ha llevado a algunos investigadores a examinar sus efectos sobre el metabolismo de los espermatozoides.

Varios andrógenos parecen estimular la glicólisis anaeróbica de espermatozoides de bovino, ya sea eyaculados o provenientes de la cola del epidídimo, pero no de los espermatozoides testiculares (123, 124, 125).

En ausencia de esteroides exógenos se encontró que los espermatozoides testiculares incorporan más lípidos que los eyaculados, aumentando en ambos casos la síntesis lipídica luego del agregado de esteroides al medio de incubación (124).

Murdock y colaboradores (123) observaron que la mayoría de los progestágenos disminuyen la cantidad de oxígeno consumida por los espermatozoides de carnero e incrementan el metabolismo anaeróbico de la glucosa.

Por su parte, todos los andrógenos y estrógenos excepto la estrona, disminuyen también el consumo de oxígeno, aunque sólo la testosterona y la androstenediona estimulan significativamente la glicólisis.

Si bien estos autores han demostrado el efecto de las hormonas esteroideas sobre el metabolismo del espermatozoide, no podemos asegurar su significado biológico, dado que las concentraciones de esteroide utilizadas ( $115-350\mu M$ ), exceden en varios órdenes de magnitud, a los niveles fisiológicos ( $30-70\text{ nM}$ ).

#### 4) cambios estructurales.

Si bien el espermatozoide al ser liberado del epitelio seminífero es ya una célula especializada, sufre una diferenciación posterior en su estructura mientras recorre el túbulo epididimario.

Por microscopía óptica se han observado cambios en la ubicación de la gota citoplasmática (resto de citoplasma que rodea a la región del cuello del espermatozoide testicular), la cual se encuentra inicialmente en el cuello de un espermatozoide de cabeza de epidídimo y migra gradualmente a lo largo de la pieza media para terminar perdiéndose en el espermatozoide maduro.

Aunque no se conocen ni la función ni el mecanismo de migración, las últimas evidencias demostrando la presencia de actina en la gota citoplasmática sugerirían la intervención de proteínas contractiles en este proceso. (126).

También han sido observados cambios en la morfología del

acrosoma. Los estudios por microscopía óptica revelan una disminución en el tamaño del acrosoma de espermatozoide de conejo (127), lo cual fue luego confirmado por microscopía electrónica (128, 129).

En otras especies que incluyen el mono (128), cobayo (130, 131), chinchilla (131) y marsupiales (132), se observó una remodelación del acrosoma a medida que los espermatozoides descienden por el epidídimo.

Es interesante hacer notar que al menos en los espermatozoides de cobayo (131) y conejo (133), existen inclusive cambios en la densidad del contenido acrosomal durante el proceso de maduración.

Aún se desconocen cómo se relacionan estos cambios con el desencadenamiento de la reacción acrosomal que es capaz de sufrir un espermatozoide maduro, pero hay evidencias de que el contenido acrosomal del espermatozoide inmaduro posee una actividad proteásica.

No se han observado sin embargo, cambios evidentes en el núcleo y organelas accesorias del flagelo, excepto la estabilización de ciertas estructuras por puentes disulfuro (perforatorium, membrana mitocondrial externa y las organelas accesorias del flagelo (89)).

Por último restan mencionar los cambios a nivel de la membrana plasmática (128, 131, 135) que por estar íntimamente ligados al

mecanismo de fertilización, se describirán detalladamente a continuación.

5) Cambios a nivel de superficie.

La interacción de un espermatozoide y un ovocito involucra una serie de eventos mediados por membrana, que en conjunto pueden considerarse básicamente como un fenómeno de reconocimiento intercelular. De aquí se hace evidente entonces el papel fundamental que juega la membrana plasmática en este proceso.

Debido a ésta íntima participación de la membrana en el mecanismo de fertilización, muchos investigadores prestaron especial interés en aquellos cambios que se producen en la superficie de un espermatozoide a medida que éste desciende por el epidídimo.

En primer lugar comencemos por aclarar que la membrana plasmática que rodea a un espermatozoide no es homogénea en cuanto a sus características bioquímicas y estructurales, sino que se encuentra dividida en varias regiones o "dominios" cuyos límites estarían definidos por las organelas subyacentes.

Así por ejemplo, los segmentos acrosomal, post-acrosomal y flagelar de un espermatozoide difieren notoriamente en el tamaño,

densidad y distribución de partículas intramembranas (136, 137), lo cual estaría reflejando de alguna manera, las funciones específicas de cada uno de estos dominios.

Durante el proceso de maduración, el espermatozoide sufre diversos cambios post-testiculares en su superficie, ya sea a nivel de la cara externa de la membrana, de la cara interna o citoplasmática, o bien dentro del mismo plano de la membrana.

Mediante la técnica de criofractura se ha demostrado una gran redistribución de partículas intramembranas en dominios restringidos de la membrana, y en zonas específicas del epidídimo (138, 139).

Si bien aún no se conocen los mecanismos que la producen, parecería estar relacionado con factores unidos a la cara externa, así como a cambios en la cantidad de material asociado a la cara citoplasmática.

Sin embargo, hasta el momento es muy poco lo que se ha encontrado respecto a las modificaciones de la estructura interna de la membrana, ya que indudablemente la mayor parte de los estudios se ha centrado en los cambios de superficie que ocurren en la cara externa y que se relacionan en forma directa con el reconocimiento del ovocito por parte del espermatozoide.

Se han utilizado varias técnicas para demostrar cambios moleculares a nivel de superficie:

- a) determinación de la densidad de residuos acídicos negativos.
- b) identificación y localización de residuos terminales de azúcares en oligosacáridos de superficie.
- c) localización histoquímica, marcación, aislamiento y caracterización de glicoproteínas.

Cada una de estas técnicas ha contribuido al mejor conocimiento de la composición molecular de la membrana plasmática y de sus cambios durante el proceso de maduración.

- a) Los primeros resultados que describen diferencias en la superficie de un espermatozoide inmaduro y otro maduro, fueron realizados por Bedford en 1963 (140), quien utilizando la técnica de electroforesis de células enteras, encontró que los espermatozoides de la cola presentaban una carga negativa mayor que los espermatozoides provenientes de cabeza, orientándose también de manera diferente en un campo eléctrico.

Estas observaciones se confirmaron más tarde por estudios ultraestructurales basados en la unión de partículas coloidales cargadas positivamente, a los sitios aniónicos de la membrana, lo

que mostró un incremento en la densidad de carga negativa de superficie durante el proceso de maduración (141, 142, 143, 144).

Es muy probable que este aumento en la carga negativa se deba a la unión de grupos acídicos, especialmente carboxilos, a proteínas y lípidos de membrana, o bien al agregado de glicoproteínas y/o glicolípidos a la superficie de un espermatozoide durante su pasaje por el epidídimo.

Esta interacción de material epididimario con la membrana del espermatozoide sería responsable de los cambios en las propiedades antigénicas de la superficie celular. (145, 146)

b) Los glicoconjugados se encuentran presentes tanto en la superficie de la gameta masculina como de las células somáticas.

Mediante el uso de técnicas citoquímicas selectivas, no sólo se los ha podido localizar en la superficie del espermatozoide epididimario, sino inclusive se ha analizado su composición evolutiva durante la maduración.

La técnica se basa en el uso de lectinas específicas, con el fin de identificar distintos mono u oligosacáridos en la superficie celular.

Las lectinas son proteínas de origen vegetal o animal, con múltiples sitios de unión de hidratos de carbono.

Cada lectina une en forma específica distintos sacáridos, presentando la particularidad de no perder su actividad biológica luego de la conjugación con componentes fluorescentes o radiactivos, por lo cual su interacción con la superficie puede visualizarse al microscopio.

Si bien las lectinas unen residuos específicos, no se ha podido discriminar si lo hacen a constituyentes glicoproteicos o glicolipídicos.

Nicolson y Yanagimachi (147) fueron los primeros en examinar la presencia de sitios ligadores de lectinas en espermatozoides de mamíferos, estudiando los cambios a través de ensayos de aglutinación, del uso de lectinas marcadas, o bien mediante la fijación de lectinas y el consecuente tratamiento con reactivos específicos.

Los resultados encontrados en varias especies, utilizando tres tipos diferentes de lectinas (WGA, RCA y Con A) indicaron que la densidad y disponibilidad de receptores para lectinas, generalmente disminuían desde la cabeza a la cola, presentando inclusive una distribución heterogénea en las distintas regiones de una misma célula, ya que la disminución era mayor en la cola que en la cabeza del espermatozoide.

Sin embargo, otros autores han hallado perfiles opuestos (148) o bien no han encontrado ningún tipo de cambio (149).



Estas modificaciones en la cantidad de receptores, no sólo se observan durante el tránsito por el túbulo epididimario, sino también luego de la eyaculación y podrían deberse a:

- degradación de glicoproteínas y de oligosacáridos de superficie por la acción de proteasas y glicosidasas respectivamente.
- agregado de nuevos residuos que completen la cadena de oligosacáridos (ej.: ácido siálico vía una sialotransferasa).
- adsorción de sustancias que puedan enmascarar los sitios disponibles de superficie.

c) Por estudios bioquímicos recientes se ha encontrado que también existen cambios específicos durante la maduración, en las macromoléculas de la cara externa de la membrana plasmática de los espermatozoides.

La mayoría de los estudios ha empleado técnicas de radiomarcación enzimática de residuos que forman parte de proteínas, glicoproteínas y glicolípidos expuestos al medio externo.

Básicamente las técnicas utilizadas son tres:

- iodinación catalizada por lactoperoxidasa para marcar residuos expuestos de tirosina e histidina.

- acción de galactosa oxidasa y posterior reducción con borohidruro de sodio para marcar restos de galactosa y de N-acetil galactosamina.
- acción de metaperiodato de sodio y posterior reducción con borohidruro de sodio para marcar restos de ácido siálico.

Utilizando el método de galactosa oxidasa (150), Olson y Hamilton (1978) (151) hallaron que los espermatozoides de la cola del epidídimo de rata mostraban una glicoproteína de 37000 que no estaba presente en el espermatozoide de cabeza.

En 1981 Olson y Danzo (152) encontraron que tanto los espermatozoides de cabeza como los de cola presentaban incorporación de radioactividad a un pico de 37000 que también pudo determinarse con las mismas características mediante el ensayo con metaperiodato.

Si el pico de 37000, reconocido tanto por el ensayo de galactosa como por el de lactoperoxidasa, representa un único componente, entonces es posible que éste se modifique (quizás por glicosilación) durante el proceso de maduración en el epidídimo.

Estas modificaciones se detectan en aquellos espermatozoides de la región de la cola proximal, coincidiendo así con la región donde los espermatozoides muestran por primera vez capacidad ferti

lizante (Olson y colaboradores, no publicados aún).

También se han encontrado en otras especies, diferentes componentes en la superficie de espermatozoides de distintas regiones del órgano.

En conejo por ejemplo, se identificaron ocho componentes, dos de los cuales (PM: 35000 y PM: 39000) están ausentes en espermatozoides de cabeza, dos (PM: 50000 y PM: 78000) están en pequeñas cantidades, y uno de PM: 86000 que se encuentra en espermatozoides de cabeza, se reduce notoriamente en espermatozoides de cola (153).

En carnero se han hallado siete componentes cuyos pesos moleculares oscilan entre 78000 y 132000, pero aquí, en contraste, con los casos anteriores, los espermatozoides de cola pierden la mayor parte de los componentes que caracterizan a un espermatozoide testicular, aunque poseen otros componentes que incluyen una proteína de 24000 (154).

A partir de estos datos se hace evidente que existen diferencias significativas en la disposición de proteínas en la superficie del espermatozoide entre las diversas especies.

Por otro lado los numerosos cambios en cuanto a los componentes de superficie entre espermatozoides de cabeza y cola, nos estarían hablando una vez más, de la modificación y/o desenmascara

miento de componentes ya presentes en espermatozoides de cabeza, o bien del agregado de nuevas estructuras provenientes del mismo espermatozoide o del entorno epididimario.

Por lo que se ha descrito hasta el momento parecen existir profundos cambios en la membrana de un espermatozoide durante su tránsito por el epidídimo.

Es muy poco probable que estas modificaciones resulten de la síntesis de nuevas proteínas por el mismo espermatozoide, ya que no está presente en esta célula la maquinaria necesaria, por lo que se deduce que serían más bien mediados por el entorno epididimario.

Dentro de las opciones que podrían explicar la aparición de nuevos componentes en la superficie, y que incluyen procesos de degradación e inserción enzimática de residuos a cadenas laterales de glicoproteínas, también habíamos mencionado el recubrimiento de la superficie del espermatozoide por materiales secretados por el epidídimo.

El análisis electroforético del fluido epididimario ha demostrado que los componentes proteicos del mismo varían a lo largo del conducto, siendo inclusive diferentes de aquellos presentes en el suero.

Esta variación de composición se debería a un proceso

continuo de secreción de algunas proteínas y reabsorción de otras (155, 156, 157, 158, 159).

Estos resultados confirmaron así estudios previos en los que se demostraba la secreción de proteínas por el epitelio epididimario, mediante el análisis bioquímico de citosol de epidídimo (160, 161), técnicas inmunológicas (162) y de radioautografía (22, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169).

Recientemente y en un estudio más profundo del fenómeno, se han aislado, purificado y caracterizado glicoproteínas epididimarias específicas en diversas especies de mamíferos. (42, 170, 171, 172, 173).

Es importante hacer notar que aún existiendo variaciones en los resultados encontrados para cada especie, todos los autores parecen coincidir en cuanto a la producción andrógeno-dependiente de proteínas de bajo peso molecular (30000 a 45000) que interactúan con la superficie que recubre la cabeza del espermatozoide.

La localización de estas glicoproteínas por técnicas inmunohistoquímicas, reveló que éstas son secretadas por el epitelio de la cabeza y el cuerpo y que están presentes en el lumen de los túbulos de la cola, donde aparecen asociadas o unidas al espermatozoide. (162, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176)

De todos modos ni las técnicas inmunohistoquímicas ni de radioautografía pudieron determinar cuán firmemente unidos están estos componentes a la membrana.

Las glicoproteínas marcadas con  $^3\text{H}$  fucosa por ejemplo, que son secretadas por epidídimo, pueden detectarse sobre la superficie de un espermatozoide intacto (167), siendo suficiente un sólo lavado para que el material radioactivo desaparezca, lo cual estaría indicando la unión débil de este componente a la superficie (Orgebin-Crist y colaboradores, aún no publicado). Otros, sin embargo, requieren procedimientos más drásticos para su extracción.

En conclusión, todo parecería indicar que la membrana plasmática del espermatozoide sufre una extensa reorganización estructural y química a distintos niveles, cuyo significado fisiológico, si bien aún poco conocido, estaría relacionado directamente con la capacidad fertilizante de la gameta.

#### Capacitación y reacción acrosomal del espermatozoide.

Aún luego de la maduración epididimaria los espermatozoides no han adquirido su completa capacidad de fertilización.

Chang (177) y Austin (178) en 1951 fueron los primeros en

observar que los espermatozoides de ciertos mamíferos requerían de un cierto período de permanencia en el tracto reproductivo de la hembra para desarrollar totalmente su potencial capacidad fertilizante.

A este fenómeno se lo denominó más tarde "capacitación" (179) y se lo define como un acondicionamiento del espermatozoide dentro de la hembra, que luego de completado permite al espermatozoide penetrar las distintas envolturas celulares y no celulares que rodean a un ovocito.

Actualmente se sabe que la capacitación es un prerequisite para la fertilización en todos los mamíferos incluyendo el hombre, con un tiempo de duración que varía según la especie (de 2 a 6 horas en animales de laboratorio y de 6 a 12 horas en la especie humana) y que se determina a través del intervalo entre la inseminación de los espermatozoides y su penetración en los ovocitos.

Existen numerosos estudios que demuestran la posibilidad de reproducir el proceso de capacitación in vitro, incubando los espermatozoides en un medio adecuado durante un tiempo suficiente (180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187), si bien aún no se puede asegurar que la capacitación in vitro e in vivo constituyan procesos fisiológicos idénticos.

Como es sabido el acrosoma de un espermatozoide está re-

cubierto por proteínas epididimarias y del plasma seminal que de algún modo estabilizan la membrana plasmática que rodea esta región.

Uno de los pasos importantes de la capacitación consistiría justamente en la pérdida de estos elementos de superficie (174, 187, 188, 189, 190), como consecuencia de agentes líticos presentes tanto dentro del mismo espermatozoide como del tracto de la hembra (191, 192, 193).

El otro paso sería una alteración de las glicoproteínas de la membrana plasmática (148, 194), que también contribuiría a la desestabilización, posiblemente reduciendo las cargas negativas o aumentando la fluidez.

Debido a que la capacitación involucraría entonces modificaciones importantes en la membrana plasmática, se postuló la existencia de cambios morfológicos correlativos, los cuales hasta el momento no han podido ser observados (191, 195, 196).

Sin embargo, sí se ha visto que durante este proceso hay una reorganización de la estructura interna de la membrana, reflejada a través de cambios de su fluidez (197), por lo que hoy se considera a la capacitación como una serie de eventos a nivel molecular que prepararían a la membrana para la llamada reacción acrosomal, que se describirá en detalle más adelante.



Acompañando a estos cambios estructurales existe un marcado incremento de la actividad respiratoria, y en la motilidad de los espermatozoides (198, 199, 200).

El intenso movimiento que presenta un espermatozoide capacitado respecto de uno eyaculado se ha definido como activación del espermatozoide, atribuyéndosele un importante papel en este fenómeno a los cambios en la permeabilidad de membrana observados durante la capacitación.

Si bien no se ha establecido aún si la activación es o no un prerequisite para la fecundación, se cree que el tipo de movimiento que exhiben los espermatozoides activados podría ser importante para un óptimo impulso de penetración en el ovocito (195).

Por otro lado Chang en 1957 (201) y otros autores posteriormente (202, 203, 204) demostraron que la capacidad fertilizante que se desarrollaba en el útero, se perdía completamente cuando los espermatozoides se incubaban con plasma seminal: decapitación, pero que podía ser recuperada luego de un nuevo período de incubación en el tracto de la hembra: recapitación.

La decapitación resultó ser inespecífica de especie ya que tanto el plasma seminal humano como el de toro eran capaces de producir efectos similares.

El factor decapacitante presente en el plasma seminal parece ser una sustancia estable, asociada a otro componente de alto peso molecular (202), que actuaría sobre la superficie de los espermatozoides ya sea enmascarando sitios receptores de la célula y previniendo así el contacto del espermatozoide con el ovocito, o bien estabilizando la membrana plasmática, particularmente sobre la región de la cabeza, con lo cual se impediría la iniciación de la reacción acrosomal y su concomitante liberación de factores líticos.

Así como la capacitación podría verse como la etapa final del proceso de maduración del espermatozoide, la reacción acrosomal representaría la culminación de los cambios que ocurren durante la capacitación. La evidencia de la reacción acrosomal en mamíferos fué reconocida primeramente por Austin en 1958 (205) y definida claramente por el mismo autor en 1963 (206).

Se ha dado el nombre de reacción acrosomal a una serie de alteraciones morfológicas que ocurren en la región acrosomal de un espermatozoide cuando éste se encuentra en las cercanías del cúmulus oophorus, y que consiste en la aparición de múltiples puntos de fusión entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa (207, 208, 209, 210, 211). Esto resulta en la formación de vesículas o discontinuidades membranasas, proceso

que se extiende hasta llegar a una región especializada de la membrana plasmática denominada "segmento ecuatorial". (Figura 4).

La interrupción de la reacción acrosomal en este punto impediría que se modifique la membrana plasmática que rodea al resto del espermatozoide, alterando por ejemplo su motilidad. (198)

Este proceso de vesiculación, cuyo estímulo probablemente provenga de las células de la granulosa que rodean al ovocito (180, 181, 212), tendría como objeto la liberación y/o activación de las enzimas contenidas en el acrosoma. Es importante aclarar que un espermatozoide muerto muchas veces presenta formas degenerativas del acrosoma que lo confunden con un espermatozoide reaccionado. En esta falsa reacción acrosomal no ocurre ni vesiculación, ni fusión de la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa (191, 213), sino que por el contrario ambas se pierden independientemente. (191, 214).

El análisis bioquímico del contenido acrosomal indicó la presencia de varias enzimas líticas (2), entre las cuales la hialuronidasa (215, 216) (distribuida en el acrosoma) y la acrosina (217) (unida a la membrana acrosomal interna) (216, 218, 219, 220, 221), han sido sin lugar a duda las más estudiadas.

Primeramente se libera la hialuronidasa, que facilita la llegada del espermatozoide al ovocito mediante la dispersión de las

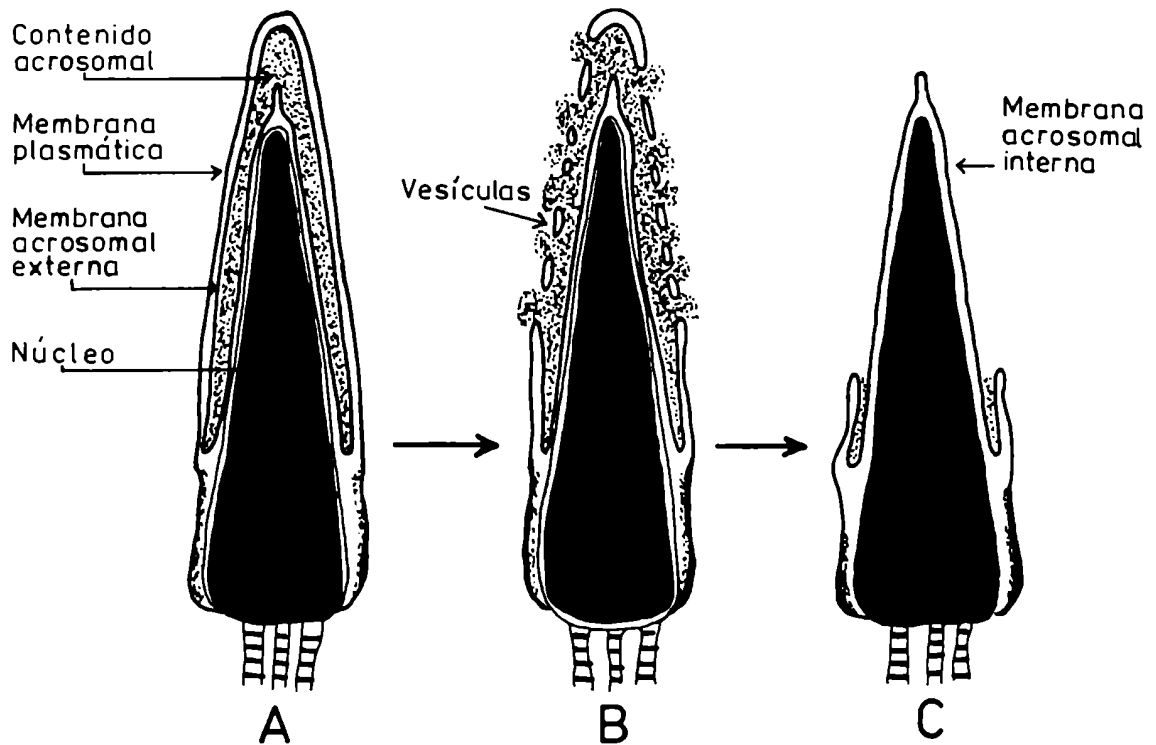


Figura 4: Sucesivas etapas de la reacción acrosomal.

A: espermatozoide intacto. B: la membrana plasmática se fusiona con la membrana acrosomal externa, creando poros a través de los cuales se libera el contenido acrosomal. C: la pérdida completa del acrosoma deja a la membrana acrosomal interna recubriendo la cabeza del espermatozoide en su porción anterior. (D.W. Fawcett. *Developmental Biology*, 1975).

células del cúmulus (222), luego, al terminar el desprendimiento de vesículas, y quedar expuesta la membrana acrosomal interna, comenzaría a actuar la acrosina que con una actividad similar a la de la tripsina (223), sería la encargada de digerir la zona pelúcida que rodea al ovocito.

De todos modos, las evidencias experimentales indicando que la acrosina es requerida para el pasaje del espermatozoide a través de la zona pelúcida son sugestivas pero no concluyentes, ya que si bien la penetración de la zona se completa en minutos, la acrosina purificada proveniente de millones de espermatozoides, es incapaz de remover la zona luego de varias horas de exposición (216). Es muy probable entonces que la degradación de la matriz glicoproteica de la zona pelúcida involucre tanto a la acrosina como a otras enzimas acrosomales incluyendo la hialuronidasa, las cuales actuarían en forma sinérgica.

Finalmente los diversos estudios in vitro han demostrado la necesidad de la presencia de lactato (224) y piruvato (225) en el medio, mientras que la glucosa por el contrario, parecería retrasar la iniciación de la reacción acrosomal. (226)

La presencia de  $Ca^{++}$  por otro lado, resulta esencial para la iniciación de la reacción (227) lo cual parece razonable si se tiene

en cuenta que el  $\text{Ca}^{++}$  intervendría en la fusión de membranas (228, 229, 230) así como también en la estimulación de motilidad que experimenta un espermatozoide capacitado.

### Estructura del ovocito.

Antes de explicar en detalle cada una de las etapas del proceso de fertilización y para un mejor entendimiento de las mismas, describiremos brevemente la estructura general de un ovocito.

El ovocito, al igual que el espermatozoide es una célula muy diferenciada que se caracteriza por tener un gran tamaño respecto al resto de las células de los mamíferos, siendo 20000 veces mayor en volumen que la gameta masculina. (231)

Como el ovocito recibe una escasa irrigación directa durante su crecimiento, en un primer estadio se lo encuentra totalmente rodeado por células foliculares, a las que necesita para satisfacer sus requerimientos funcionales.

En esta etapa, la membrana del ovocito u oolema y la de las células foliculares están muy próximas entre sí, e incluso en ciertos puntos pueden observarse engrosamientos del tipo de los desmosomas que parecen unir a ambas membranas. Probablemente a través de estos desmosomas se transmitan los iones y nutrientes al ovocito en desarrollo. (232)

Posteriormente, entre el oolema y la membrana de las células foliculares, comienza a formarse una estructura periférica y translúcida denominada zona pelúcida que se origina a partir del material secretado tanto por el ovocito como por las células que lo rodean. (233, 234)

Esta estructura básicamente está compuesta por proteínas y carbohidratos en forma de glicopéptidos estabilizados por puentes disulfuro (S-S) o uniones salinas (235), en vista de lo cual no resulta sorprendente su fuerte carácter antigénico. (236)

La zona pelúcida es la encargada de dar la especificidad de especie al proceso de fertilización, atribuyéndosele además la función de absorción, utilización y transporte del material aportado al oolema por las células foliculares y de aquel introducido al ovocito por pinocitosis.

Por debajo del oolema y en forma periférica aparecen los gránulos corticales, originados del complejo de Golgi (237), ricos en glicoproteínas (238) y destinados a impedir la poliespermia durante la fertilización.

En un estadio más avanzado comienza a acumularse una sustancia líquida entre las células foliculares, que termina por formar una gran cavidad dejando al ovocito rodeado por unas pocas células: la corona radiata.

Durante este período se completa la formación de la zona pelúcida y de los gránulos corticales, a la vez que se origina el primer corpúsculo polar (morfológicamente semejante al ovocito) que permanece por debajo de la zona pelúcida.

Al acercarse la ovulación, aparece entre el oolema y la zona pelúcida el llamado espacio perivitelino y finalmente, como resultado de la ovulación, se libera un ovocito que en la mayoría de los mamíferos aparece rodeado por miles de células, relativamente separadas entre sí y embebidas en una matriz gelatinosa: el cúmulus oophorus.(239) Los estudios sobre la composición bioquímica de la matriz del cúmulus han indicado al ácido hialurónico como el principal componente (240). Las células por su parte, muestran prominentes evaginaciones y microvellosidades y son capaces de secretar estrógenos y progesterona (241).

Luego de la ovulación, el ovocito permanece inactivo y arrestado en metafase II, hasta el momento de ponerse en contacto con el espermatozoide, provocándose la segunda división meiótica y la expulsión del segundo corpúsculo polar. La Figura 5 esquematiza la estructura que presenta un ovocito de mamífero luego de ser ovulado.

Las distintas envolturas que rodean a un ovocito constituyen barreras mecánicas que el espermatozoide debe atravesar para poner



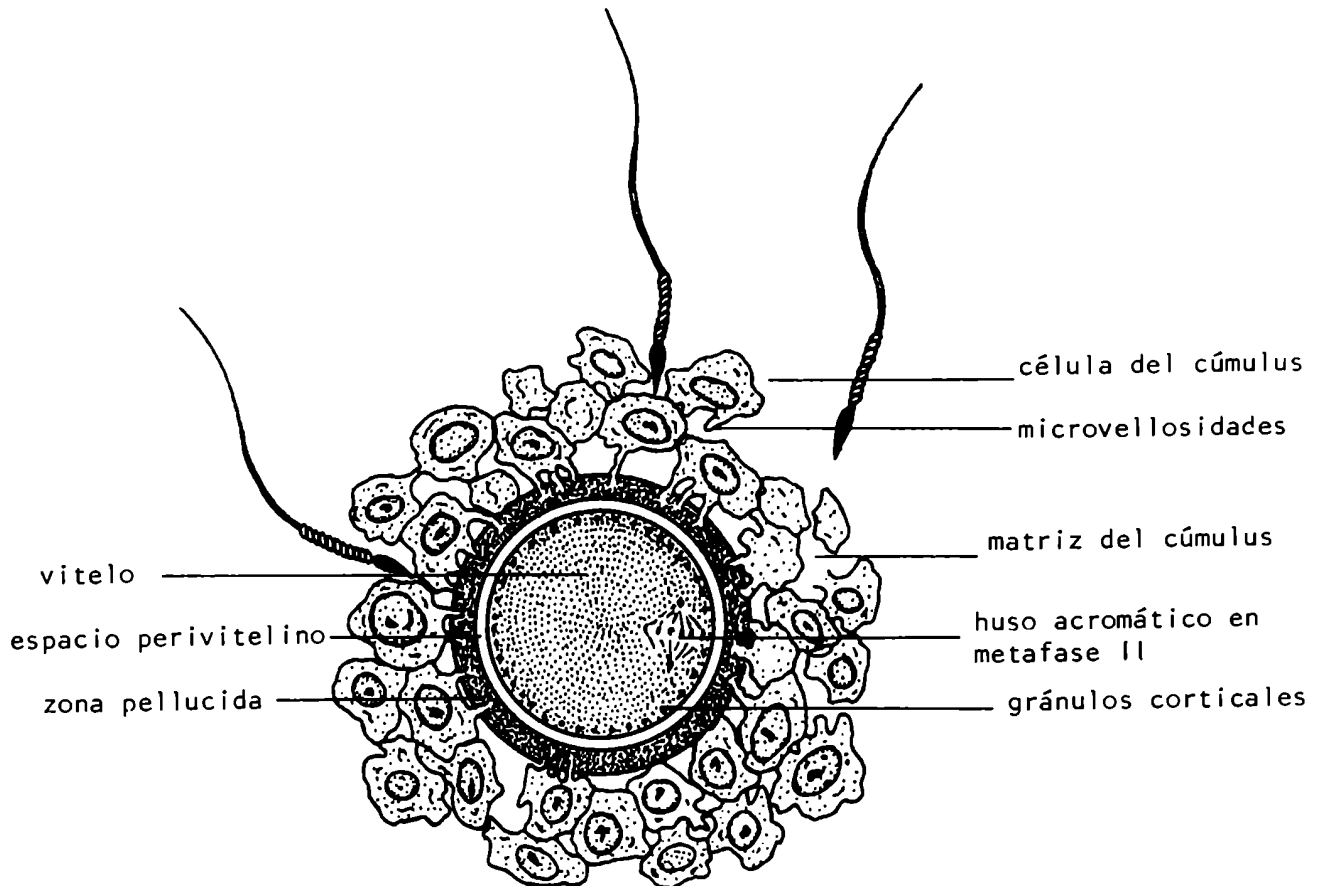


Figura 5: Disposición de los diversos componentes de un ovocito de mamífero recientemente ovulado.

se en contacto con el óvulo.

Para ello deberá primero interactuar con las células del cúmulus, unirse al exterior de la zona pelúcida y, luego de penetrarla, interactuar directamente con la membrana plasmática del ovocito.

El proceso continúa con la fusión de las respectivas membranas, bloqueándose la entrada de espermatozoides adicionales mediante la descarga del contenido de los gránulos corticales en el espacio perivitelino.

#### Proceso de fertilización.

El proceso de fertilización en mamíferos consiste en una secuencia de eventos cuidadosamente ordenada:

- 1) Pasaje del espermatozoide a través de la envoltura celular que rodea al ovocito.
- 2) Unión del espermatozoide a la superficie de la zona pelúcida.
- 3) Penetración de la zona pelúcida.
- 4) Fusión del espermatozoide con el vitelio del ovocito.
- 5) Activación del ovocito y desencadenamiento de los mecanismos de prevención de la poliespermia.:
  - a) Reacción cortical
  - b) Reacción vitelina
  - c) Reacción de zona

## 6) Formación y fusión de pronúcleos.

A continuación describiremos cada una de estas etapas, como así también los diversos mecanismos involucrados en las mismas.

- 1) El pasaje del espermatozoide a través del cúmulus oophorus está mediado tal como se mencionara anteriormente, por la acción de la hialuronidasa, enzima que degrada las uniones entre glicoproteínas y ácido hialurónico presentes en la matriz del cúmulus.

Como consecuencia de esta dispersión celular, el espermatozoide ya tiene acceso al ovocito en sí, poniéndose en contacto con la zona pelúcida.

- 2) La unión del espermatozoide a la superficie de la zona pelúcida aparentemente ocurre a través de la membrana plasmática que rodea al acrosoma (214, 242), aunque no se descarta una participación de la región post-acrosomal.

Hartmman en 1972 (243) observó que las gametas se asociaban in vitro a través de una compleja serie de interacciones durante las cuales muy probablemente tuviera lugar la reacción acrosomal.

Estas interacciones consisten en una primera asociación débil, independiente de la temperatura (ya que puede ocurrir tanto

a 2° como a 37°,) reversible por pipeteo, e inespecífica de especie; "adhesión", seguida 30 a 40 minutos después por una asociación fuerte, no reversible, dependiente de la temperatura y de la especie: "unión".

Está demostrado que durante ambas etapas, tanto el espermatozoide como el ovocito sufren modificaciones. Los resultados indican que los espermatozoides que previamente han sufrido el proceso de adhesión, al ponerse en contacto con nuevos ovocitos, se unen a éstos más rápidamente que aquellos no tratados. Posiblemente la modificación que ocurre en el espermatozoide durante esa primera asociación, consista en la conversión de proacrosina en acrosina activa.

Para el caso del ovocito, la adhesión modificaría la superficie de la zona pelúcida, ya que ovocitos previamente sometidos a sólo 10 minutos de esta interacción lograron unir espermatozoides más rápidamente. (244)

Como se vió anteriormente, la unión de espermatozoides al ovocito tarda de 30 a 40 minutos en establecerse. Contrariamente a ésto la unión de espermatozoides a zonas pelúcidas aisladas, requiere sólo de 5 a 10 minutos en establecerse, lo cual sugeriría la participación de algún factor del vitelo en la interacción de

las gametas evitando la rápida unión que ocurre a las zonas aisladas (Figura 6).

Una prueba de ello la encontramos en las curvas que se obtienen al representar la unión en función de la concentración de espermatozoides. Mientras la unión de espermatozoides a zonas pelúcidas sigue una relación lineal, la unión a ovocitos enteros muestra una curva sigmoideal, que estaría hablando de un posible efecto cooperativo del factor vitelino.

Todos estos distintos procesos de unión entre ovocitos y espermatozoides pueden considerarse como interacciones de tipo receptor-ligando entre estructuras complementarias presentes en ambas células.

Estos supuestos "receptores" han sido localizados en la zona pelúcida del ovocito, observándose que los espermatozoides se unen tanto a la cara interna como externa de zonas pelúcidas previamente aisladas (245,246). Se concluye entonces que los receptores podrían estar presentes a través de toda la zona, manteniendo una fuerte asociación entre las gametas hasta que el espermatozoide alcanzara el vitelo.

En 1976 Gwatkin y colaboradores observaron en el hamster, que la exposición de la zona pelúcida a 65° durante 35 minutos,

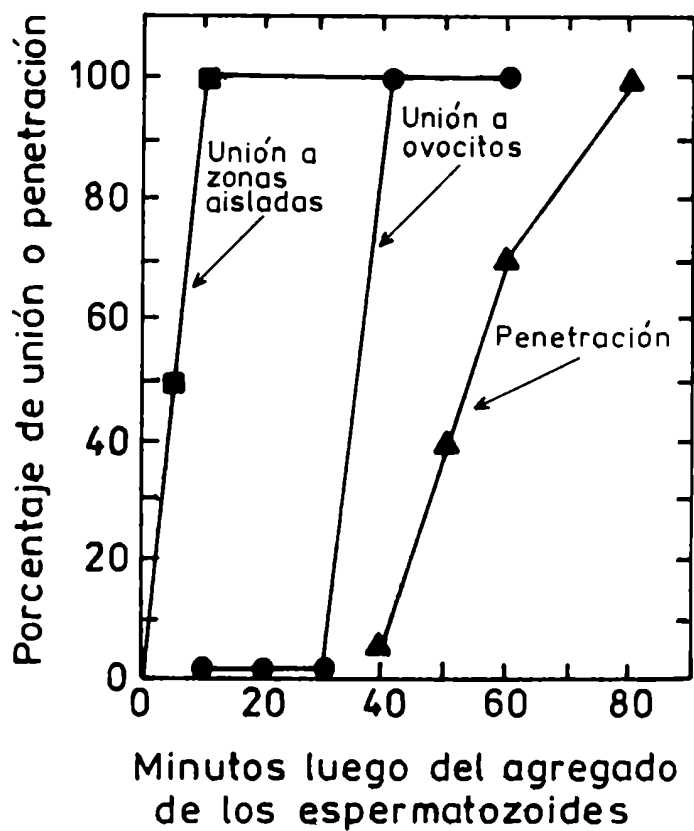


Figura 6: Cinética de unión de espermatozoides a zonas pelúcidas aisladas y de unión y penetración a los ovocitos enteros. (Hartmann y colaboradores, 1972).

permitía la liberación de un factor soluble, que de estar presente durante la interacción entre gametas, bloqueaba la habilidad de los espermatozoides de unirse a los ovocitos y fertilizarlos.

Este hecho se interpretó posteriormente como una inhibición de tipo competitivo del sitio del espermatozoide, por parte del factor de zona.

Dado que estos receptores son sensibles a la actividad de enzimas proteolíticas (tripsina, quimotripsina, acrosina, etc.), se piensa que estarían compuestos por proteínas, aunque la presencia de hidratos de carbono (233) en la zona, no excluye una estructura de tipo glicoproteica.

Nada se conoce sin embargo hasta el momento, sobre la naturaleza del receptor complementario en la gameta masculina.

- 3) Si asumimos que la acrosina es la enzima lítica que permite al espermatozoide atravesar la zona, la pregunta que surge es ¿dónde se localiza?

Si estuviera uniformemente distribuída en el acrosoma, se liberaría casi completamente en las primeras etapas de la reacción acrosomal. Sin embargo, los espermatozoides poseen actividad proteolítica aún luego de perderse la membrana plasmática y el contenido acrosomal (247).

Bedford en 1968 (248) propuso que la acrosina estaría unida a la membrana acrosomal interna, mientras que otros autores como Yanagimachi (249) y Barros (250), sugirieron su localización en el segmento ecuatorial, que al menos en hamster, aparece vesiculado durante la penetración. Ya que la acrosina soluble puede destruir como vimos anteriormente los receptores de la zona pelúcida, es poco probable que se liberen cantidades significativas de esta enzima en las cercanías del ovocito durante la fertilización.

Los inhibidores de acrosina hallados en el espermatozoide tendrían por lo tanto como función, la inactivación de aquella acrosina soluble liberada accidentalmente por espermatozoides dañados (251).

La penetración del espermatozoide a través de la zona pelúcida, proceso que dura entre 4 a 22 minutos, se produce oblicuamente al ovocito, aunque en ciertas ocasiones ocurre en forma radial (252), estando facilitada por los movimientos de cabeza que desarrolla el espermatozoide luego de la capacitación.

4) Luego de haber penetrado la zona pelúcida, el espermatozoide debe atravesar el espacio perivitelino que existe entre la zona pelúcida y la superficie del ovocito (1 a 2 segundos) (253), antes de alcanzar la membrana vitelina (254).



Cuando ello ocurre las microvellosidades del ovocito en - vuelven la cabeza del espermatozoide y las membranas de ambas gametas se comienzan a fusionar.

Aunque varios autores han cuestionado la necesidad de la reacción acrosomal como un prerequisite para la fusión (255), actualmente se considera que sólo los espermatozoides reaccionados son capaces de fusionarse a la membrana vitelina (256).

Contrariamente a lo que ocurre en los invertebrados, donde el contacto inicial con el ovocito se produce por la membrana acrosomal interna del espermatozoide, en los mamíferos el proceso de fusión se lleva a cabo entre la membrana vitelina y la membrana plasmática que recubre la región posterior de la cabeza del espermatozoide (207, 213, 239, 249, 255).

Si bien la fusión se realiza por una zona específica del espermatozoide, la uniformidad de la membrana vitelina permite que la interacción se lleve a cabo por cualquier punto de la superficie del ovocito.

Es probable que los receptores presentes en el oolema sean capaces de interactuar exclusivamente con una población específica de macromoléculas localizadas en la región post-acrosomal, lo cual daría la especificidad de unión.

De todos modos se necesitan muchos estudios para identificar las propiedades específicas de esta región que resulta esencial para el reconocimiento y fusión entre gametas.

Cuando la fusión del espermatozoide con el vitelo se ha completado, el citoplasma del ovocito protrusiona para rodear al núcleo del espermatozoide, formando lo que se denomina cono de fertilización.

El proceso de fusión del espermatozoide con el vitelo presenta una menor especificidad de especie, si se lo compara con la penetración de zona.

Hanada y Chang (257) encontraron que los espermatozoides de rata y ratón son capaces de penetrar el vitelo de ovocito de hamster sin zona, si al igual que la fusión homóloga, los espermatozoides están previamente capacitados.

- 5) Cuando un espermatozoide se fusiona con el ovocito, se desencadena una serie de eventos morfogénéticos en la corteza del vitelo, destinados a impedir la entrada de otros espermatozoides presentes ya sea en las cercanías de la zona pelúcida o dentro del espacio perivitelino.

Esta prevención de la poliespermia involucra tres reacciones sucesivas:

a) reacción cortical. b) reacción vitelina. y c) reacción de zona.

a) Reacción cortical.

En el momento en que un espermatozoide alcanza el vitelo, la mayoría de los gránulos corticales fusionan sus membranas con el oolema y descargan el contenido cortical (proteasas, lectinas, mu copolisacáridos, glicoproteínas) al espacio perivitelino, muy probablemente por exocitosis. Este proceso inducido por la fusión de membranas, pero no por el simple contacto entre ellas, se conoce en con junto como reacción cortical (258).

La reacción cortical se propaga luego alrededor de todo el ovocito partiendo del punto de asociación entre el espermatozoide y la membrana vitelina (259).

En muchas especies la reacción cortical no requiere necesariamente del contacto entre el ovocito y el espermatozoide, ya que otros mecanismos de activación (osmóticos, temperatura, schok e - léctrico, exposición a la luz, etc.) también son capaces de provocar la.

Esta inducción artificial de la reacción cortical podría explicarse asumiendo que los gránulos corticales presentan una carga neta negativa que normalmente los mantiene alejados de la cara in-

terna de la membrana vitelina, cargada también negativamente (260).

La proximidad de una carga positiva cambiaría entonces la polaridad del oolema desapareciendo la anterior repulsión electrostática y reduciéndose la distancia que separa a los gránulos corticales de la membrana vitelina.

Quizás, justamente una importante función de la zona pelúcida sea la de proteger al vitelo del posible contacto con partículas positivas del oviducto, antes de que comience la fertilización.

Se ha observado que el  $\text{Ca}^{++}$  juega un importante papel en la reacción cortical, pero debido a que el ionóforo A23187 también es capaz de inducir la reacción aún en la ausencia del ión, se postula más bien una liberación del  $\text{Ca}^{++}$  intracelular, principalmente proveniente del espermatozoide (261).

#### b) Reacción vitelina.

Como resultado de la reacción cortical se produce una reconstitución de la membrana vitelina por el agregado de las membranas de los gránulos corticales (262). Esta reorganización que altera las propiedades de la membrana vitelina de modo tal de hacerla impenetrable para el resto de los espermatozoides, se denomina reacción vitelina y ocurre 2 a 3 horas luego de la fertilización.

Un ejemplo de estas alteraciones lo constituye el mayor número de sitios de unión de lectinas (263), y el aumento de grupos cargados negativamente que se observan en la membrana vitelina luego de la fertilización (141).

Acompañando a estos cambios de composición, se suma el probable efecto de las enzimas proteolíticas liberadas, que modificarían proteínas de superficie, entre las cuales se encuentran los factores de reconocimiento que tiene la membrana plasmática para el espermatozoide.

c) Reacción de zona.

Como mencionáramos anteriormente la reacción cortical provoca la liberación del contenido de los gránulos corticales al espacio perivitelino.

Austin y Braden en 1956 (264), propusieron que estos factores liberados podrían modificar la estructura y/o composición molecular de la zona pelúcida, inactivando o eliminando los sitios receptores específicos de especie, que la zona posee para los espermatozoides.

Este proceso, llamado reacción de zona, ocurre 15 minutos después de la fertilización y altera la zona pelúcida de modo tal que

los espermatozoides ya no pueden unirse a ella ni penetrarla (256, 264, 265).

El rol de los gránulos corticales en el bloqueo de la poliespermia ha sido demostrado para los ovocitos de numerosos mamíferos (266).

En aquellos casos en los cuales se observa poliespermia espontánea, tal como ocurre en el conejo, los estudios por microscopía electrónica indicaron que los gránulos corticales se encontraban retenidos en el ovocito, sugiriendo un defecto en la reacción cortical (267).

En la rata y el ratón, el bloqueo involucra cambios en la composición físico-química tanto de la membrana vitelina como de la zona pelúcida, mientras que por el contrario en el hamster, el primer bloqueo de la poliespermia se limita a la zona pelúcida y en el conejo a la membrana plasmática (141, 263).

La hipótesis de que los gránulos corticales pudieran tener diferentes funciones en la fertilización, sugiere que los mismos podrían presentarse como una población morfológica y bioquímicamente heterogénea y mas aún que pudiesen liberarse diferentemente en el espacio perivitelino luego de la ovulación.

También se ha observado que la reacción de zona es un proceso dependiente del estadio del ovocito y del tiempo que transcurre

rre una vez que ha sido ovulado. Es así que los ovocitos de hamster obtenidos 17 horas luego de la administración de HCG, exhiben una completa fertilización monoespérmica, mientras que los recuperados 21 a 24 horas después de la inyección de hormona, presentan alrededor de 2 y 9 espermatozoides por ovocito respectivamente (268). A tiempos aún mayores, los ovocitos descargan el contenido de los gránulos corticales espontáneamente y se vuelven resistentes a la penetración de zona (269).

Esta descarga espontánea no ocurre en cambio en el ratón, la rata y el conejo para los cuales se observa una creciente poliespermia en función del tiempo (270).

6) Poco tiempo después de que un espermatozoide logra incorporarse al citoplasma del ovocito, su membrana nuclear se desintegra mediante un proceso de vesiculación similar al que ocurre en la reacción acrosomal.

Comienzan a aparecer entonces agregados de pequeñas partículas alrededor de la cabeza del espermatozoide, mientras la cromatina que hasta el momento se mantenía condensada, empieza a dispersarse y difundir en el ooplasma (271).

Luego de la descondesación comienza a formarse una envoltura nuclear que encierra a la cromatina del espermatozoide for

mando el pronúcleo masculino.

A través de diversas observaciones se ha sugerido la presencia en el ooplasma de un factor responsable de la formación y crecimiento del pronúcleo masculino, aunque hasta el momento su existencia es sólo hipotética (272).

Concomitantemente a la fusión entre las membranas plasmáticas de las gametas, aparece el segundo cuerpo polar, permaneciendo unido al ovocito fertilizado, por lo menos hasta el estadio de pronúcleos (273).

Simultáneamente a este proceso se dispersan los cromosomas del ovocito, los cuales rápidamente resultan rodeados por una envoltura bilaminar, originándose el pronúcleo femenino. Los dos pronúcleos se dirigen juntos hacia la región central del ovocito y sus membranas comienzan a interdigitarse.

Finalmente la cromatina vuelve a condensarse, las envolturas de los pronúcleos se rompen y comienza la asociación de los genes materno y paterno, proceso denominado singamia, dando lugar a un único núcleo diploide.

En la cigota así formada no existe ninguna envoltura rodeando al material genómico y recién en el estadio de 2 células, aparece la membrana nuclear. Luego de la primera división mitótica o clivaje



celular, la cigota comienza una fase de crecimiento y desarrollo caracterizado por cambios en la organización y composición del citoplasma.

Este período de desarrollo post-fertilización, que incluye la formación del blastocisto, constituye el denominado período de preimplantación.

## OBJETIVOS

A lo largo de la introducción hemos visto que los espermatozoides que salen del testículo son incapaces de fertilizar a un ovocito, adquiriendo dicha capacidad como consecuencia de un proceso de maduración andrógeno dependiente que tiene lugar mientras éstos transitan por el epidídimo.

El hecho de que la mayoría de los cambios observados durante la maduración ocurran a nivel de la membrana plasmática de los espermatozoides, ha dado origen a numerosos trabajos que intentan relacionar este proceso con los productos secretorios epididimarios.

Estos productos podrían actuar ya sea alterando el medio que rodea a los espermatozoides y creando así las condiciones favorables para su maduración, o bien interactuando directamente con los mismos modificando sus propiedades de superficie.

De todos modos, hasta el momento no se ha podido establecer ninguna relación directa entre el proceso de maduración y conocidos componentes andrógeno-dependientes del fluido epididimario tales como GPC, carnitina o ácido siálico, existiendo por el contrario una gran cantidad de evidencias que señalan a las proteínas epidi

dimarias como los posibles factores madurantes.

La síntesis y secreción al lumen de proteínas epididimarias ha sido demostrada por distintos autores en varias especies (155, 157, 275), sin embargo, los primeros resultados identificando proteínas epididimarias específicas (PEE), andrógeno-dependientes, provienen de trabajos realizados en nuestro laboratorio por Cameo y Blaquier (161).

Mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, estos autores encontraron tres bandas en el citosol de epidídimo de rata (C, D, E) cuya intensidad disminuiría al utilizar citosol de animal castrado, volviendo a recuperarse en el caso del animal inyectado con andrógenos.

Luego de la purificación de PEE, se estudiaron algunas de sus propiedades físico-químicas, encontrándose que las mismas eran glicoproteínas de bajo peso molecular (22000 para C y 36000 para D-E) de naturaleza acídica (171) y con un 10,5% de hidratos de carbono en su composición (274).

El requerimiento de andrógenos para la síntesis de PEE, conjuntamente con la andrógeno-dependencia de la maduración de los espermatozoides, sugirió una participación de las glicoproteínas en este proceso.

Esta hipótesis cobró real importancia a través de los experimentos de Orgebin-Crist y Jahad (276), quienes utilizando túbulos mantenidos en cultivo, mostraron que la adquisición de capacidad fertilizante por parte de los espermatozoides, obtenida en respuesta a la estimulación androgénica, podía ser bloqueada por el agregado simultáneo al medio de cultivo, de antiandrógenos o inhibidores de las síntesis proteica y del RNA.

Más aún estos mismos autores encontraron más tarde (277), que el efecto de los andrógenos sobre los túbulos cultivados podía reproducirse totalmente al utilizar un extracto de citosol epididimario previamente tratado con carbón. Este extracto estaría teóricamente libre de esteroides y otras pequeñas moléculas lo cual implicaría que las macromoléculas (proteínas) serían las responsables de los efectos observados.

A raíz de estos resultados nuestro laboratorio se orientó hacia un estudio más profundo de la interrelación entre estimulación androgénica, síntesis proteica y proceso de maduración.

La producción de anticuerpos específicos permitió el desarrollo de una técnica cuantitativa de medición de PEE, la fijación de complemento, con ayuda de la cual se determinó que la cantidad de PEE unida a los espermatozoides era tres veces mayor en la co-

la que en la cabeza del epidídimo, siendo este último segmento el principal sitio de síntesis de las proteínas (176).

El aumento en la cantidad de glicoproteínas unidas a los espermatozoides que se observa a medida que éstos descienden por el órgano, podría explicar muchos de los cambios de superficie encontrados durante la maduración, tales como el mayor número de sitios de unión de lectinas(147)y/o la adquisición de antígenos de superficie (146,162) y de partículas cargadas negativamente (140,141,142), que bien podrían deberse al agregado de moléculas cargadas como lo son las glicoproteínas.

Por otro lado los experimentos de inmunofluorescencia revelaron que las PEE se localizaban principalmente en la región acrosomal del espermatozoide (278) y el análisis del efecto de la capacitación sobre la cantidad de PEE unida a los espermatozoides, indicó que aproximadamente el 50% de las mismas se pierden luego de la capacitación tanto in vivo (4 hs.) como in vitro (6 hs.) (279).

La pérdida de glicoproteínas asociadas a los espermatozoides que ocurre durante la capacitación, es un fenómeno que como ya describiéramos anteriormente, conduce a la desestabilización de la membrana plasmática y su consiguiente fusión con la membrana acrosomal externa (reacción acrosomal). Puesto que para ser efecti-

va, la reacción acrosomal debe tener lugar en las cercanías del ovocito, se podría suponer que una de las funciones de la cubierta glicoproteica fuera precisamente la de estabilizar la membrana plasmática impidiendo así la ocurrencia de una prematura reacción acrosomal durante la estadía del espermatozoide en el tracto genital masculino.

Al respecto se han descrito en el plasma seminal del conejo (280) y en el fluido epididimario del ratón (187), del hamster (281) y del cobayo (189, 281), componentes de naturaleza proteica capaces de ejercer dicho efecto sobre los espermatozoides, y a los cuales se les ha dado el nombre de "factores decapacitantes".

Las propiedades de PEE y las características de su interacción con los espermatozoides permitirían especular para estas glicoproteínas un rol estabilizador de membrana; sin embargo el hecho de que las PEE no se pierdan por completo durante la capacitación, permaneciendo un remanente de las mismas sobre los espermatozoides, sugiere que las PEE podrían estar involucradas en el proceso de fertilización.

Se consideró entonces de interés estudiar más detalladamente la localización de esas proteínas remanentes en el espermatozoide para determinar su posible presencia en zonas de la membra-

na que jugasen algún rol en el reconocimiento del ovocito y/o posterior fusión de membranas.

Con este propósito, se desarrolló una técnica inmunohistoquímica, altamente sensible, de peroxidasa anti peroxidasa (PAP), mediante la cual se observó que en los espermatozoides capacitados y reaccionados, las proteínas se localizan en la membrana que se extiende por detrás del segmento ecuatorial, resultado de gran importancia si se tiene en cuenta que la región post-acrosomal del espermatozoide es el sitio por donde se lleva a cabo la fusión con la membrana vitelina del ovocito (282).

Numerosos grupos de investigación han descrito la asociación de glicoproteínas a la superficie de los espermatozoides de diversas especies (151, 154, 170, 172, 173), sin embargo, podemos afirmar que aún se desconoce el significado fisiológico de este tipo de interacción.

Por tal razón, el objetivo de este trabajo consistió en : investigar si aquellas glicoproteínas epididimarias andrógeno-dependientes que interactúan con los espermatozoides, cumplen algún papel biológico en el proceso de maduración.

Aunque son muchos los parámetros utilizables como indicadores del grado de maduración de un espermatozoide (motilidad, metabo -

lismo, ultraestructura, etc.), decidimos estudiar la participación de estas glicoproteínas, en uno de los cambios más significativos que sufre el espermatozoide durante su tránsito por el epidídimo: la adquisición de capacidad fertilizante.

No obstante, puesto que para fertilizar a un ovocito, el espermatozoide debe primeramente reconocer y unirse a la zona pelúcida del mismo y dado que las glicoproteínas son moléculas íntimamente relacionadas a los procesos de reconocimiento intercelular, consideramos fundamental evaluar la participación de las mismas en esta primera etapa del proceso de fertilización.

Cabe aclarar que la gran dificultad que presenta el manejo de gametas en la rata, nos llevó a utilizar al hamster como animal de experimentación, por ser esta especie sumamente adecuada para el desarrollo de las diversas técnicas y ensayos biológicos que requerían nuestros estudios.

Este trabajo se ha dividido básicamente en dos partes:

Primera Parte: Identificación y caracterización parcial de proteínas andrógeno-dependientes en el epidídimo del hamster.

Segunda Parte: Estudio del papel biológico de las proteínas epididimarias en el proceso de maduración de los espermatozoides.



## MATERIALES Y METODOS

### Primera Parte

#### Animales y tratamiento

Para esta serie de estudios se utilizaron hamsters machos pertenecientes a la cepa "Mesocricetus Auratus" cuya edad osciló entre 8 y 10 semanas (adultos), con excepción del estudio de aparición de proteínas con la edad, para el cual se emplearon animales de 23, 30, 35, 45, 60 y 90 días.

Estos animales fueron criados bajo un régimen estricto de 14 hs. de luz y 10 de oscuridad, a una temperatura de entre 22 y 24°C recibiendo agua y alimento balanceado ad libitum.

La mayor parte de los mismos provinieron del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME), si bien en algunas ocasiones se utilizaron animales gentilmente cedidos por el Centro Panamericano de Zoonosis.

Para aquellos estudios que requiriesen animales castrados y/o reinducidos por diferentes tiempos, se procedió como se describe a continuación.

Los animales sometidos a castración se anestesiaron con

éter etílico, realizándose la intervención por vía escrotal o abdominal, con especial cuidado en no dañar el epidídimo ni su irrigación sanguínea.

La reinducción de los animales durante los diferentes períodos se efectuó mediante una inyección diaria de 300 ug de Testosterona administrados por vía subcutánea.

En todos los casos los animales fueron sacrificados por anestesia con éter el día del experimento, y sus epidídimos disecados cuidadosamente.

#### Drogas y soluciones .

La testosterona empleada en los casos de reinducción, fue provista por Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo). El aceite vegetal estéril usado como vehículo en el tratamiento hormonal, fue gentilmente obsequiado por Laboratorios Gador, Bs. As.

La preparación de la T para estos experimentos se realizó disolviendo la hormona en acetona, luego de lo cual se agregó el volumen de aceite vegetal necesario para obtener la concentración deseada, evaporándose finalmente la acetona a 50° C durante toda la noche.

Las mezclas de 20 aminoácidos tritiados (NET-250) y Carbono catorce (NEC-445) fueron adquiridas a New England Nuclear (Boston, MA) y utilizadas en el estudio de incorporación diferencial de aminoácidos marcados.

Todos los reactivos empleados en la preparación de geles de poliacrilamida, se adquirieron en Bio Rad Laboratories, mientras que el ágar (Noble), provino de DIFCO (Detroit, Mich. U.S.A.). La albúmina sérica bovina (BSA), el inhibidor de tripsina de poroto de soja (SBTI) y la ovoalbúmina (OA) utilizados como sustancias patrones en la determinación del peso molecular, fueron provistos por Sigma Chemical Company (St. Louis, MO).

Tanto el Tris (hidroximetil) amino metano (Trizma Base o Tris) marca Sigma, como las restantes drogas empleadas para la preparación de los bufferes, fueron de grado analítico, utilizándose agua bidestilada para la preparación y/o dilución de los mismos. Luego de los ajustes de pH a 5° C, todos los bufferes fueron congelados hasta su uso.

Los bufferes utilizados fueron:

		moles/litro	
PBS	ClNa	0.14	
	$\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.0043	
	$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$	0.01	
	$\text{N}_3\text{Na}$	(0.02 %)	
Tris-Glicina	Tris	0.05	pH:8.3
(Tris-Gly)	Glicina	0.38	
	$\text{N}_3\text{Na}$	(0.02 %)	
Tris	Tris	0.050	pH:7.8
	Sacarosa	0.250	
	EDTA	0.015	
	Ditiotreitol (DTT)	0.00025	

#### Marcación in vitro de las proteínas

El estudio de la influencia de los andrógenos sobre la síntesis proteica se llevó a cabo según la técnica descrita por Katzenellenbogen y Gorski (283). Para ello se utilizaron 2 lotes de machos adultos que fueron sacrificados conjuntamente luego de ha-

ber recibido diferentes tratamientos. Uno de los lotes correspondía a un grupo de animales castrados durante 15 días, mientras que el restante lote estaba integrado por animales que luego de un período de 5 días de castración, habían recibido durante 10 días, una inyección diaria de 300 ug de T por vía subcutánea.

Los epidídimos de animales castrados ya sea con o sin tratamiento androgénico, se lavaron y cortaron con tijera en pequeños trozos, y una cantidad entre 50 y 100 mg de tejido se incubó con una mezcla de 40 uCi de aminoácidos tritiados y 15 uCi de aminoácidos  $^{14}\text{C}$ , respectivamente, durante 3 horas a  $31^{\circ}\text{C}$ , en un buffer Krebs Ringer Fosfato, pH: 7.4.

Finalizada la incubación el tejido fue lavado exhaustivamente con PBS y homogenizado para la posterior obtención de la fracción citosólica.

#### Preparación de los citosoles.

Inmediatamente luego de sacrificar los animales (normales, castrados o reinducidos), los epidídimos fueron extraídos, pesados y cortados con tijera sobre un baño de hielo. Para el caso del tejido incubado con aminoácidos marcados, finalizada la incubación, éste fue lavado con solución salina, continuándose en adelante del mismo mo-

do que en el resto de los casos.

Se procedió entonces a la homogenización del tejido mediante un homogenizador Polytrón (Brinkmann) en 3 volúmenes (respecto del peso inicial del tejido) de buffer Tris 50 mM, pH : 7.8. Los homogenatos se centrifugaron a 105.000 g durante 60 minutos a 4º C en una centrífuga Beckman LS-50, obteniéndose un precipitado que se descarta y una fracción soluble o citosol en el sobrenadante.

Tanto el hígado como el músculo, el testículo, la próstata y las vesículas seminales utilizadas para los estudios de origen y especificidad de las proteínas, fueron tratados y procesados de la misma forma descripta para el tejido epididimario.

En todos los casos se tomaron alícuotas de 10 a 20 ul de citosol para la determinación de proteínas según el método de Lowry y colaboradores (284).

#### Extracción de proteínas de la superficie del espermatozoide.

Los espermatozoides de cabeza, cuerpo y cola se obtuvieron por sucesivos cortes de cada una de estas regiones en 1 ml de buffer PBS, pH : 7.4, luego de lo cual se efectuó en todos los casos una agitación con Vortex a temperatura ambiente durante 1 o 2 minutos, a fin de facilitar la salida de los mismos.

Los espermatozoides testiculares se obtuvieron en cambio, por punción de la rete testis de animales cuyos conductos eferentes habían sido previamente ligados por espacio de 24 horas.

Una vez recogidos los espermatozoides, se procedió a efectuar el tratamiento de extracción salina de las proteínas asociadas a su superficie, el cual constó de los siguientes pasos:

- 1) la suspensión de espermatozoides en PBS se centrifugó durante 10 minutos a 1000 rpm, con lo cual se obtuvo un primer sobrenadante,  $SN_1$ , y un primer precipitado,  $Ppdo_1$ .
- 2) el  $Ppdo_1$  se redisolvió en PBS al cual se le había agregado la cantidad de NaCl necesaria para alcanzar una concentración final de 0.25 ó 0.5 M y se lo centrifugó 10 minutos a 1000 rpm obteniéndose, el  $SN_2$  y el  $Ppdo_2$ .
- 3) el  $Ppdo_2$  se redisolvió nuevamente en PBS 0.25 ó 0.5 M, se incubó en NaCl 30 a 40 min. a temperatura ambiente con agitación leve y se volvió a centrifugar 10 min. a 1000 rpm para obtener el  $SN_3$  y el  $Ppdo_3$ .

Este último sobrenadante,  $SN_3$ , fue en definitiva la muestra que se utilizó posteriormente para el análisis de las proteínas extraídas.

Finalmente, tanto los citosoles como los extractos proteicos de los espermatozoides fueron analizados mediante la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida que se describirá a continuación.

#### Análisis electroforético.

##### a) Tratamiento de las muestras

Las extracciones salinas de los espermatozoides y los citosoles obtenidos para el estudio de la síntesis proteica, fueron primeramente dializados contra 100 volúmenes de buffer Tris-Gly (pH : 8.3) durante 16 horas a 4<sup>o</sup> C, con el fin de eliminar el ClNa y la radioactividad no asociada a proteínas.

Los túbulos de diálisis fueron pretratados secuencialmente con etanol: agua 1:1, bicarbonato de sodio 1 N, EDTA 1 mM y agua destilada. Cabe aclarar que el procedimiento de diálisis no fue necesario en el caso de los restantes citosoles.

Finalmente alícuotas de entre 30 y 80 ug de proteínas y 80 ul de volumen como máximo, se mezclaron con algunos cristales de sacarosa para aumentar su densidad y con 5 ul de azul de bromofenol (0.1 % en agua) como indicador del frente de corrida. Todas las muestras se mantenían a -20<sup>o</sup> C hasta el momento de su uso.



b) Armado de los geles de poliacrilamida

En todos los casos se utilizaron geles de poliacrilamida al 10 % que se prepararon según la técnica descripta por Raymond y Weintraub (285).

Los pasos seguidos fueron los siguientes:

1) Preparación de la solución 1 sobre baño de hielo:

Solución 1

Acrilamida al 15 %	10 ml
N, N metil bis acrilamida al 1%	4.5 ml
Buffer Tris-Gly concentrado	2.0 ml
agua bidestilada	2.95 ml
mercaptoetanol (0.14 M)	0.25 ml
sacarosa	1 gr

2) Eliminación del O<sub>2</sub> disuelto en la solución, mediante vacío durante 2 a 3 minutos.

3) Agregado de 10 ul de N, N, N', N' tetrametil diamina (Temed) como catalizador, y de 0.2 ml de persulfato de amonio como iniciador (0.0375 gr en 0.5 ml de agua). Esta mezcla se colocó en la cámara soporte del gel cuyas medidas eran : 10.5 cm (largo), 8.2cm

(ancho) y 0.3 cm (espesor), agregándose una capa de agua bidestilada sobre el borde superior del gel, con el fin de obtener una superficie libre de irregularidades.

- 4) Luego de 16-24 horas y completada la polimerización, se retira el agua depositada y se reemplaza por aproximadamente 2 a 4 ml de la solución espaciadora ó stacking, preparada por mezcla de: 1 parte de solución A., 2 partes de solución B, 1 parte de solución C y 4 partes de agua.

<u>Solución A:</u>	HCl 1N	48 ml
	Tris Base	5.98 gr
	Temed	0.46 ml
	agua	hasta 100 ml
<u>Solución B:</u>	Acrilamida	10 gr
	Bis acrilamida	2.5 gr
	agua	hasta 100 ml
<u>Solución C:</u>	Riboflavina	4 mg
	agua	hasta 100 ml

En esta capa de stacking se inserta un molde que permite

la formación de "dientes" de separación, donde se aplican posteriormente las muestras.

La irradiación de esta mezcla con luz fluorescente desencadena su polimerización en aproximadamente 1 hora, razón por la cual esta solución debió guardarse en frío y en oscuridad.

c) Electroforesis

La electroforesis se realizó en un aparato Pharmacia Fine Chemical GE-4, utilizando una fuente de poder Buchler de corriente continua. En todos los casos se trabajó a voltaje constante y a una temperatura de 4° C, empleándose Tris-Gly 1:10 pH: 8.3 como buffer de corrida.

La primera etapa consistió en una precorrida durante 10 minutos a 200 volts, luego de lo cual se procedió a la colocación de las muestras. Para el caso en el que posteriormente se analizara la incorporación de aminoácidos marcados a las diferentes bandas proteicas, se realizó una co-electroforesis de las muestras que consistió en la siembra de una mezcla de alícuotas de citosol de epidídimos castrados y reinducidos conteniendo igual cantidad de proteínas.

Desde el momento de la siembra y en adelante, los geles fueron corridos a un voltaje constante de 200 volts que correspondía

a unos 20 a 25 mA por gel. Una vez que las muestras hubieran atravesado el gel espaciador, la corrida se acompañaba por un reflujo constante de buffer.

La electroforesis finalizaba generalmente al cabo de 2 a 3 horas de iniciada la corrida.

d) Procesamiento de los geles.

Luego de ser retirados de las cámaras, los geles se tificaron o cortaron en fracciones según el tipo de análisis posterior.

La tinción se realizó sumergiendo al gel toda una noche a temperatura ambiente, en una solución de azul de Coomassie (2 % vol/vol en agua) preparada en una mezcla de fijación (metanol 40 % vol/vol en agua y ácido acético 10 % vol/vol en agua). La decoloración se llevó a cabo durante varias horas, mediante 2 ó 3 lavados con una solución de metanol (16 % vol/vol en agua) y ácido acético (4 % vol/vol en agua).

La inducción de la síntesis de proteínas se determinó midiendo la radioactividad asociada a las distintas bandas. Para ello cada gel fue cortado en 70 a 75 fracciones de 1 mm de espesor, que se transfirieron a viales de conteo conteniendo 100 ul de agua oxigenada al 30 % . Los viales se taparon herméticamente y se mantuvieron a

20°C durante 16 a 20 horas. Luego del agregado de 7 ml de una solución al 4% de Protosol (New England Nuclear Boston, MA) en tolueno centelleante (4 gr Omnifluor New England Nuclear, por litro de tolueno), los viales se taparon y agitaron fuertemente hasta obtener una emulsión. El precipitado formado se disolvía generalmente repitiendo esta operación 1 ó 2 veces por día.

Para minimizar la fotoluminiscencia de la mezcla utilizada, los viales se mantuvieron en oscuridad las 24 horas previas al conteo.

La radioactividad correspondiente a los dos isótopos en cada fracción se cuantificó utilizando un contador de centelleo líquido Beckman LS 100, con una eficiencia del 35 % para  $^3\text{H}$  y 94 % para  $^{14}\text{C}$ . Finalmente se calculó el índice  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  para cada fracción.

### Densitometría

Esta técnica fue utilizada con el objeto de cuantificar los cambios ya observados por tinción de geles, en las glicoproteínas PE<sub>1-6</sub>, como resultado de la castración y posterior reinducción androgénica.

Para tal fin se utilizó un espectrofotómetro Beckman Quartz (California, U.S.A.), acoplado a un registrador.

Los geles fueron colocados en cámaras o cubetas (de 10 cm x 1 cm) las cuales se deslizaron frente a un haz de 550 nm, a una velocidad igual a la escogida para el registrador, de manera tal que el gráfico resultante coincidiese con el tamaño real del gel. Esto nos permitió correlacionar fácilmente los picos obtenidos en el gráfico con las bandas teñidas correspondientes al gel.

Luego de que las seis glicoproteínas fueron identificadas en los gráficos, se procedió a calcular la proporción en que cada una de ellas se encontraba respecto del total de muestra, tarea que se llevó a cabo pesando el área recortada de cada uno de los picos. Finalmente los resultados se expresaron como el porcentaje de  $PE_{1-6}$  / total de muestra para el caso de los citosoles normal, castrado y reinducido.

#### Cálculo de los Pesos Moleculares de las proteínas

Los pesos moleculares de las diferentes glicoproteínas se estimaron siguiendo el método de análisis de regresión lineal de Ferguson (286). Para ello muestras de citosol de epidídimo de hamster normal se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 7.5, 10, 12 y 14 %.

Se calcularon las movilidades electroforéticas (Rf) de cada

una de las PE<sub>1-6</sub> y de las sustancias marcadoras utilizadas : albúmina sérica bovina (BSA) PM : 67000, ovoalbúmina (OA) PM : 43500 e inhibidor de tripsina de poroto de soja (SBTI) PM : 22700, luego de lo cual, fueron graficados en función de los porcentajes de acrilamida (% T).

Mediante la extrapolación de Rf a concentración cero de acrilamida se obtuvieron los valores de  $Y_o$ , los cuales a su vez permitieron calcular los diferentes  $K_r$  (coeficientes de retardación) para cada banda, utilizando la siguiente expresión:

$$\log (Rf) : \log Y_o - K_r \cdot T$$

$$K_r :- \frac{(\log (Rf) - \log Y_o)}{T}$$

Por último, a través del gráfico PM en función del  $K_r$ , se calcularon los PM correspondientes a cada banda.

#### Ensayo de tinción de PAS

La presencia de hidratos de carbono en la composición de las proteínas epididimarias PE<sub>1-6</sub>, se determinó mediante la técnica de ácido periódico-reactivo de Schiff (PAS), tal como lo describen Zaccharius y colaboradores (287).

## Segunda Parte

### Animales y tratamiento

Para esta segunda parte de los estudios utilizamos hamsters hembras de la cepa "Mesocricetus Auratus", ya sea prepúberes, es decir entre 5 y 7 semanas de edad, o bien adultas, no mayores de 90 días. Los machos por su parte, tenían de 8 a 10 semanas de edad. Estos animales fueron criados en las mismas condiciones descriptas anteriormente en la primera parte de esta sección.

La superovulación de las hembras prepúberes, inducida mediante la administración de gonadotrofinas, consistió en una inyección subcutánea de 30 unidades (UI) de gonadotrofina de suero de yegua preñada (PMS), seguida de una inyección intraperitoneal de 40 UI de gonadotrofina coriónica humana (HCG) 48 a 72 horas más tarde. De esta manera la ovulación se producía 12 a 17 horas luego de la inyección de HCG.

Para el caso de animales adultos, el tratamiento hormonal se efectuó sobre aquellas hembras que estuviesen en período de estro en el momento de la administración de PMS. Para identificar las hembras que se encontraban en dicho estadio del ciclo sexual se procedió a la observación a simple vista de las características del moco cer-



vical, mediante el estiramiento del mismo con ayuda de un elemento introducido en la vagina. Se seleccionaron aquellas hembras que presentaran un moco tal que al ser estirado produjera un largo filamento transparente.

Los mismos procedimientos se emplearon para superovular las ratas Wistar utilizadas en los estudios finales de acción del anticuerpo anti-DE sobre el espermatozoide maduro. Para estos casos las ratas hembras prepúberes tenían entre 25 y 30 días de edad, no siendo aconsejable utilizar hembras que estuviesen fuera de dicho período.

Mediante la superovulación inducida por gonadotrofinas, ya sea en el caso de las hembras prepúberes o adultas, se obtuvieron un promedio de 20 a 30 ovocitos por animal, los cuales no presentan diferencias en cuanto a su posibilidad de ser fecundadas, respecto de aquellos obtenidos como resultado de una ovulación espontánea (288).

#### Drogas y soluciones

Tanto la PMS como la HCG provistas por los laboratorios Sigma o Serono, se prepararon en solución fisiológica, fraccionándolas en viales conteniendo 30 y 40 UI, respectivamente, que correspondieron a un volumen de 80 ul en ambos casos, luego de lo cual se guardada

ron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. La solución de hialuronidasa empleada para remover las células de la granulosa, se preparó disolviendo 450 UI de hialuronidasa (Sigma, St. Louis) proveniente de testículo bovino y 1 % de polivinil pirrolidona (PVP) en buffer fosfato.

El medio Brinster (BMOC) (289), utilizado para mantener los espermatozoides en los distintos ensayos, fue preparado en el laboratorio y su composición es la siguiente:

ClNa	87.3 mM
ClK	4.63 mM
Cl <sub>2</sub> Ca	1.71 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.98 mM
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.19 mM
ácido láctico	19.2 mM
CO <sub>3</sub> HNa	23.6 mM
rojo fenol	5 mg/ml
ácido pirúvico	0.32 mM

Es importante aclarar que este medio fue preparado con agua deionizada y esterilizada gentilmente por el Instituto de Neurobiología.

Las soluciones salinas balanceadas de Hank y Earle, uti-

lizadas en los cultivos, como así también el medio 199 preparado en base a los dos tipos de soluciones salinas, fueron marca DIFCO (Detroit, Mich. U.S.A.).

Sus respectivas composiciones son las que se indican a continuación:

	<u>Hank</u>	<u>Earle</u>
	(gr/l)	(gr/l)
ClNa	6.8	6.8
ClK	0.4	0.4
Cl <sub>2</sub> Ca	0.2	0.2
SO <sub>4</sub> Mg	0.2	0.2
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K	0.125	0.125
Bactodextrosa	1.0	1.0
CO <sub>3</sub> HNa	0.66	2.2
rojo fenol	0.02	0.12

La penicilina y la estreptomicina provinieron de laboratorios Squib y Abbot respectivamente.

El suero fetal bovino, marca Gibco, fué adsorbido previamente con carbón activado al 0.5 % (P/V), con agitación magnética y bajo condiciones estériles, a 0° C durante 30 minutos. La suspensión

fue centrifugada a 1500 g, 10 minutos a temperatura ambiente y el sobrenadante filtrado a través de una membrana Millipore (Bedford, Massachusetts), de 0.4  $\mu$  de diámetro de poro, usando portafiltros Swinnex-25 (Millipore). Finalmente fue distribuido en alícuotas de 3 ml, y congelado a  $-20^{\circ}$  C.

Las mezclas de aminoácidos  $^3\text{H}$  y  $^{14}\text{C}$ , la DHT, los  $3\alpha$  y  $3\beta$  androstandioles y la cicloheximida utilizados en los cultivos fueron marca Sigma (St. Louis, MO).

El acetato de ciproterona, por su parte, fue gentilmente cedido por laboratorios Gador S.A. (Bs. As., Argentina).

Todos los bufferes y soluciones utilizados en el cultivo fueron esterilizados mediante filtración, empleándose para su preparación agua bidestilada.

Las operaciones realizadas durante el cultivo de tejido se llevaron a cabo con material estéril y bajo atmósfera también estéril proveniente de un aparato de flujo laminar (Edgegard, Baker, Co. Inc. Sanford, Maine, U.S.A.).

Todos los reactivos utilizados para la preparación de geles de poliacrilamida corresponden a los ya descritos en la primera parte de Materiales y Métodos.

La peroxidasa anti peroxidasa (PAP) utilizada en los estudios de rata, provino de Polysciences, el p-formaldehído de labora-

torios Carlo Erba, la 3-3' diamino-bencidina (DAB) de Laboratorios Sigma y el segundo anticuerpo (anti-IgG de conejo en oveja) fue facilitado por la Clínica de Endocrinología (Bs. As.). El resto de las drogas empleadas fueron de grado analítico.

#### Obtención y preparación de los ovocitos

Para la recuperación de los ovocitos se procedió a sacrificar las hembras 12 a 17 horas después de la administración de HCG, extrayendo ambas trompas de Falopio de cada animal, las cuales fueron colocadas en medio BMOC y observadas bajo lupa (Carl Zeiss, Germany), utilizando un aumento de 40 X.

Mediante el uso de un elemento punzante se rasgó la zona más hinchada y transparente de la trompa, que es aquella donde se concentran los ovocitos. De este modo salían rápidamente por la herida provocada, un conjunto de ovocitos que se mantenían unidos por las células del cúmulus; en este momento las trompas eran retiradas.

Para el caso en que se requiriesen ovocitos libres de células foliculares, los cúmulus se trataban con solución de hialuronidasa (450 UI) durante 5 minutos, luego de lo cual los ovocitos limpios se lavaban 2 o 3 veces con BMOC para eliminar la hialuronidasa del medio.

Los manipuleos de ovocitos y de cúmulus se realizaron me diante el uso de pipetas Pasteur de diámetro muy pequeño fabricadas en el laboratorio.

#### Obtención y preparación de las suspensiones de espermatozoides.

Luego de sacrificar los animales, los epidídimos se extraían cuidadosamente removiendo los restos de tejido adiposo que pudiesen presentar.

Se procedía luego a la separación del segmento requerido para el ensayo, el cual una vez obtenido, se colocaba en una cápsula estéril (de 3 cm de diámetro) donde eran cortados con tijera 2 o 3 veces de modo tal de provocar la salida de los espermatozoides. Luego de ello, el tejido era retirado y la gota de espermatozoides obtenida se diluía en el volumen necesario de BMOC (a 37° C) como para que la concentración final de la suspensión resultase aproximadamente  $10^7$  espermatozoides/ml. Esta operación se realizó sobre una platina (Multi Block Heater Lab Line), mantenida a 37° C para evitar el deterioro del espermatozoide. Es necesario utilizar cápsulas Tissue culture (Falcon), debido a que el tratamiento al que son sometidas en su fabricación impide la adherencia de los espermatozoides a las mismas.

Las concentraciones de espermatozoides se determinaron

en todos los casos mediante el uso de un hemocitómetro.

#### Delimitación de los distintos segmentos epididimarios

Previo a la realización de cualquier estudio sobre maduración del espermatozoide, fue imprescindible definir los distintos segmentos en los que se dividiría al epidídimo, teniendo en cuenta que los mismos debían ser francamente diferenciables entre sí, con límites lo suficientemente netos entre cada uno de ellos como para que la división del órgano fuese reproducible en todos los casos.

Las cinco zonas finalmente elegidas en nuestro esquema experimental se diferenciaron principalmente por el diámetro de sus tubos y correspondieron a cabeza (H), cuerpo proximal ( $B_1$ ), cuerpo distal ( $B_2$ ), cola proximal ( $T_1$ ) y cola distal ( $T_2$ ) representadas en la Figura 7.

#### Ensayo de unión de espermatozoides a la zona pelúcida de los ovocitos

Los ovocitos utilizados para esta técnica se obtuvieron 15 a 17 horas después de la inyección de HCG, recuperándose en todos los casos en forma de cúmulus.

Estos cúmulus en algunos casos se trataron directamente con hialuronidasa, utilizándose los ovocitos libres para el ensayo de unión.

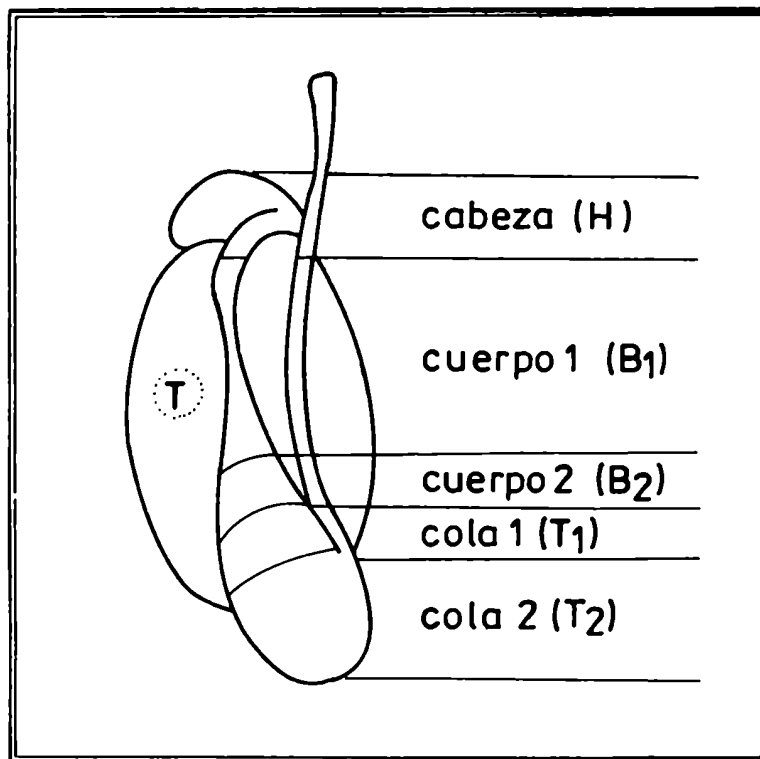


Figura 7: Esquema de las diversas regiones epididimarias.



En otras ocasiones los cúmulus se colocaron en una gota de BMOC ubicada en una cápsula de Petri y luego de cubrirla con aceite mineral estéril se los incubó durante 2 horas a 37° C bajo atmósfera de 95 % de aire y 5 % de CO<sub>2</sub>. Finalizada la incubación los cúmulus se sometían a la acción de hialuronidasa durante 5 minutos.

Una tercer variante consistió en tratar los cúmulus con hialuronidasa y una vez obtenidos los ovocitos limpios, incubarlos en BMOC bajo aceite durante 2 horas en las mismas condiciones antes mencionadas.

Los ovocitos preparados de cualquiera de estas tres formas se colocaban en grupos de aproximadamente 10, en una gota de 20 ul de BMOC cubierta con aceite estéril. Sobre esta gota se colocaba 20 ul de la suspensión de espermatozoides (10<sup>7</sup> esperm./ml), mantenida a 37° C.

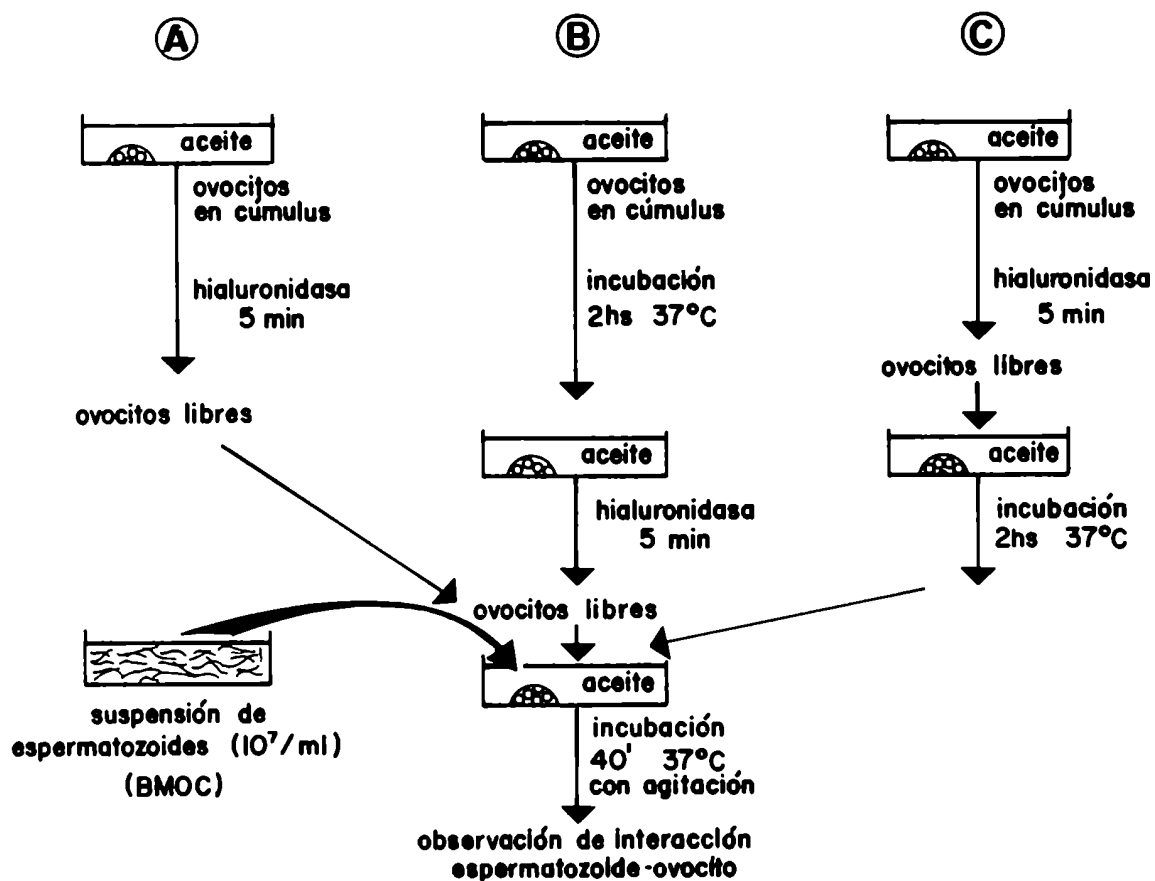
La incubación de ovocitos con espermatozoides se hizo en cápsulas Tissue culture, bajo atmósfera de carbógeno, en un incubador Vicking (modelo Dubnoff), durante 40 minutos a 37° C, con agitación suave (50 oscilaciones/min).

Finalizada esta incubación, se retiraban los ovocitos y se lavaban 3 veces mediante sucesivos pasajes de los mismos a gotas de solución fisiológica. Esta operación se realizaba con la ayuda de una fina pipeta Pasteur (Fisher Scien, Pittsburg), cuyo diámetro per

mitía remover los espermatozoides que no estuviesen firmemente unidos, tal como lo describen Hartmann y colaboradores (243).

Los ovocitos se montaban y observaban al microscopio óptico, contándose aquellos espermatozoides enteros unidos a la zona pelúcida de cada uno de ellos.

Nuestra experiencia indicó que sólo pueden distinguirse con claridad no más de 20 espermatozoides unidos a un mismo ovocito. El siguiente diagrama esquematiza los pasos descriptos:



### Inseminación in vivo de los espermatozoides

Las inseminaciones in vivo de los espermatozoides se efectuaron siguiendo básicamente la técnica empleada por Lubicz-Nawrocki (290). Para ello 9 a 14 horas después de la administración de HCG, las hembras se anestesiaron con éter, practicándose una incisión medio-ventral en las mismas, a través de la cual se expusieron los cuernos uterinos. Alrededor de la base de cada uno de ellos se ubicó una ligadura que se mantuvo "floja" durante la introducción de los espermatozoides. Estos se inseminaron en un volumen de 100 ul con una jeringa estéril de 1 ml (Dyscart, libre de pirógenos), cuya aguja (siliconada) se introdujo en el centro de la ligadura. Posteriormente la ligadura se cerró fuertemente para retener la suspensión y evitar una transmigración entre cuernos (290).

### Elección del criterio de fertilización

Para definir el criterio de fertilización a utilizar se realizó un estudio observando los distintos estadios de fertilización que presentaban los ovocitos en función del tiempo transcurrido a partir del momento de la inseminación.

Para ello se inseminaron las hembras con espermatozoides de cola distal del epidídimo, efectuándose la observación de los ovoci

tos fecundados, 10, 12, 15, 17, 21, 24 o 48 horas después.

Los ovocitos se recuperaron tal como lo describiéramos anteriormente y se montaron para su observación al microscopio óptico. El montaje consistió en colocar sobre un portaobjetos una gota de 5 a 15 ul de solución fisiológica, con no más de 5 ovocitos,

Sobre esta gota se ubicó un cubreobjetos (20 mm.20mm), en cuyos cuatro vértices se había colocado previamente una pequeña cantidad de vaselina. De este modo se evitaba una posible dispersión de la gota y por ende la pérdida del material.

Para la observación de los ovocitos se empleó un microscopio (Phillip Harris, England).

Los criterios considerados fueron:

- a) observación de espermatozoide en el espacio perivitelino del ovocito.
- b) observación de dos cuerpos polares, dos pronúcleos y cola de espermatozoide en el citoplasma del ovocito.
- c) observación de clivaje celular.

Dado que podían distinguirse claramente los distintos estados que presentaban los ovocitos fecundados, en ningún caso se hizo necesario recurrir a la técnica de tinción para una mejor visualiza -

ción de los mismos.

### Perfiles de capacidad de unión y de capacidad fertilizante

El perfil epididimario de capacidad de unión a la zona pelúcida se realizó aplicando el ensayo de unión antes descrito, a espermatozoides provenientes de las regiones H, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y T<sub>2</sub> de un epidídimo recién extraído del animal.

Transcurridos los 40 minutos necesarios para la interacción, se recuperaron los ovocitos, se contaron los espermatozoides unidos a cada uno de ellos y finalmente se calcularon los porcentajes de ovocitos que presentaron 0, 1-5, 5-10 o más de 10 espermatozoides unidos. En aquellos casos en que fue posible, los resultados se expresaron también como el número promedio de espermatozoides unidos por ovocito. Para determinar el porcentaje de fertilidad de cada una de las regiones del epidídimo, se utilizó el siguiente esquema experimental: un grupo de 8 hembras prepúberes, previamente estimuladas por el tratamiento con gonadotrofinas, se dividió en dos lotes de 4 animales cada uno. Por su parte, un macho adulto fue operado bajo anestesia con éter, extrayéndosele uno de sus epidídimos y permaneciendo el órgano contralateral dentro del animal vivo, hasta el momento

de ser utilizado. El epidídimo se dividió cuidadosamente en las 5 regiones ya estipuladas, preparándose las suspensiones de cada una de ellas tal como se describiera anteriormente.

Se procedió entonces a la inseminación in vivo de los espermatozoides, 7 a 9 horas después de la administración de HCG. Los espermatozoides de las zonas H, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y T<sub>1</sub> del órgano, se inseminaron en los cuernos uterinos derechos de cada hembra, colocando en los cuernos izquierdos las suspensiones de espermatozoides de T<sub>2</sub> utilizadas como control.

El volumen introducido en cada cuerno fue de 100 ul y la concentración aproximadamente de  $10^7$  espermatozoides por mililitro en todos los casos.

Finalizada la inseminación de estas 4 hembras, se tomaba el lote restante, procediéndose de igual forma pero esta vez con los espermatozoides provenientes del epidídimo contralateral.

#### Preparación de la fracción proteica enriquecida en PE<sub>1-6</sub>

El extracto enriquecido en glicoproteínas andrógeno-dependientes de epidídimo de hamster fue obtenido por Piñeiro y colaboradores mediante una cromatografía del citosol epididimario en una columna de DEAE-Sephadex (171), La fracción eluída entre 0.12 y 0.25 M

de NaCl, fue recolectada, dializada y finalmente liofilizada. El posterior análisis en geles de poliacrilamida al 10 %, indicó que esta fracción se encontraba enriquecida en las glicoproteínas PE<sub>1-6</sub>.

Los mismos pasos de purificación se emplearon para el citosol epididimario proveniente de animales castrados por 30 días.

La Tabla I muestra la composición porcentual del citosol y de las fracciones enriquecidas provenientes de epidídimos normales y castrados, calculada a través de una densitometría a 550 nm de los geles correspondientes.

#### Cultivo de órgano.

La extracción de aquellos epidídimos destinados a cultivo se realizó en el laboratorio bajo condiciones de asepsia, colocándose los órganos de inmediato en cápsulas de Petri de 6 cm de diámetro conteniendo medio 199 (Hank); el resto del procesamiento del tejido fue efectuado en cuarto de cultivo estéril.

Mantenidos en medio 199 (Hank), los epidídimos fueron disecados cuidadosamente bajo lupa con material de cirugía esterilizado, separándose él o los segmentos requeridos de acuerdo al tipo de estudios a realizar.

Una cantidad entre 50 a 100 mg de tejido, preparado en for

Tabla I

Fracción	Citosol(%)	Fracciones enriquecidas (%)	
		Normal	Castrado
EP <sub>1-6</sub>	18	30	8
EP <sub>2</sub> y EP <sub>3</sub>	6	16	2
Albúmina	8	10	14
otras proteínas	74	60	78

El material analizado correspondió a un citosol epididimario de animal normal y a las fracciones eluidas (entre 0.12 y 0.25 MNaCl) de una columna de Sephadex, provenientes de un citosol epididimario de animal normal (control) o castrado por 30 días. 100 ug de cada una de estas muestras fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida, los cuales se tiñeron en azul de Coomasie para la identificación de las bandas y luego se sometieron a análisis densitométrico a 550 nm.



ma diferente de acuerdo al segmento a cultivar, se colocó sobre grillas de acero inoxidable (Falcon) que a su vez fueron depositadas en cápsulas para cultivo de órgano (60 x 15 mm Nº 3037 Falcon Dickinson and Co, Cockeysville, MD, U.S.A.)

La cámara interna, bajo la grilla, fue llenada con medio 199 (Earle) o BMOC, hasta tomar contacto con el tejido y en la cámara externa se colocó aproximadamente 1 ml de agua bidestilada estéril. Las cápsulas se incubaron por 24, 48 o 72 horas en una estufa a 33° C, bajo atmósfera de carbógeno (95 % O<sub>2</sub> y 5 % CO<sub>2</sub>), realizándose un cambio de medio por día.

Los esteroides (DHT, 3  $\alpha$  y 3  $\beta$  androstandioles) y el acetato de ciproterona fueron preparados en etanol y agregados directamente al medio de cultivo en pequeños volúmenes, de modo tal que las concentraciones finales alcanzadas fueran de 0.1 a 2 uM para la DHT, 2 uM para los dioles y 4 uM para el acetato de ciproterona.

La cicloheximida por su parte, se preparó en medio 199 (Earle) agregándose en una concentración 20 uM.

El extracto epididimario enriquecido se agregó al medio de cultivo hasta obtener una concentración final de 1 mg/ml, salvo en los casos en que se especifique lo contrario.

Los epidídimos de rata fueron cultivados de la misma for-

ma descripta para el hamster.

Para el estudio del efecto de anti-DE sobre la capacidad fertilizante de los espermatozoides de T<sub>2</sub>, se agregaron directamente al medio de cultivo, el suero de conejo normal (SCN) y el anticuerpo anti-DE en las concentraciones de 0.1 mg/ml para ambos casos.

#### Síntesis de proteínas en cultivo.

El esquema seguido para estudiar la síntesis de proteínas en cultivo y su posterior asociación al espermatozoide fue el siguiente: los túbulos epididimarios proximales (H y B<sub>1</sub>) fueron lavados con solución salina de Hank durante 1 hora inmediatamente luego de ser extraídos del animal. Una cantidad entre 50 y 100 mg de tejido fue incubada en aproximadamente 0.6 ml de BMOC, suplementado con 10% de penicilina-estreptomicina (P-E) y 0.5% de BSA y mantenido en cultivo bajo atmósfera de carbógeno por espacio de 17 hs., luego de lo cual los túbulos fueron lavados nuevamente con BMOC y cultivados por un período adicional de 10 hs. Esta incubación, cuya duración total resultó de 27 hs., se realizó con el fin de disminuir los andrógenos endógenos y el pool de aminoácidos intracelulares.

Finalmente los túbulos se lavaron exhaustivamente con medio 199 (Hank) y se cultivaron otras 17 hs. en un medio con la siguiente

te composición.

- 0.6 ml de BMOC
- L-Metionina, concentración final 1 mM.
- P-E (concentración final 100 UI/ml y 100 mg/ml respectivamente).
- 10  $\mu$ ci de una mezcla de 20 aminoácidos tritiados.

Aquellos túbulos que además fueron estimulados con hormona recibieron DHT en una concentración final de 2  $\mu$  M, mientras que en los controles el esteroide fue reemplazado por un volumen igual de etanol.

Luego de este pulso de 17 hs. con aminoácidos tritiados, los tejidos (inducido y control) se lavaron varias veces con solución salina, para luego procederse a la recuperación de los espermatozoides en 0.3 ml de BMOC.

Una vez recogidos los espermatozoides, el tejido fue secado, pesado y homogeneizado en 5 volúmenes de buffer Tris-Gly 1:10, con un homogeneizador Potter Elvehjem (vidrio-vidrio), para la obtención posterior de la fracción citosólica.

Por su parte, los espermatozoides fueron sometidos al tratamiento de extracción salina de las proteínas asociadas a su superficie, siguiendo la secuencia de etapas ya descritas en su oportunidad.

Los citosoles de tejido y las proteínas de espermatozoides se separaron en bandas proteicas mediante la electroforesis en geles de poliacrilamida al 10 % durante 2-3 hs. a 200 volts.

Los geles se cortaron en 70-75 fracciones de 1 mm de espesor continuando el procesamiento de la forma ya descrita en la primera parte de Materiales y Métodos.

Finalmente la inducción de la síntesis de proteínas se determinó midiendo la radioactividad asociada a las distintas fracciones y calculándose el índice  $\text{cpm } ^3\text{H del túbulo tratado} / \text{cpm } ^3\text{H del túbulo control}$ .

#### Control histológico - Morfometría.

Se tomaron muestras de aproximadamente 50 mg, de cuerpo proximal (B<sub>1</sub>) de epidídimos recién sacados del animal, cultivados durante 24 horas sin andrógeno y cultivados 24 hs. con DHT en una concentración  $2\mu\text{M}$ . El tejido se fijó en solución de Bouin, se deshidrató por las técnicas habituales y se incluyó en parafina. Finalmente se obtuvieron cortes de 4 de espesor que fueron coloreados con hematoxilina-eosina.

El análisis morfométrico de los cortes fijados y teñidos se realizó mediante observación directa a través de un ocular graduado

(escala micrométrica ocular 5/100), en un microscopio Zeiss, con un aumento de 100 y 400 veces.

Ensayo de peroxidasa anti-peroxidasa (PAP).

Se utilizó la técnica descrita por Sternberger y col. (291) pero con ligeras modificaciones.

Los extendidos de espermatozoides provenientes de túbulos de cola distal del epidídimo de rata se secaron al aire, se fijaron con p-formaldehído al 4 % durante 10 minutos a temperatura ambiente y se lavaron 2 veces con buffer Tris 0.05 M pH : 7.6.

Posteriormente se incubaron con distintas soluciones en una cámara húmeda y en la siguiente secuencia: anti-DE (dilución 1 : 100) toda la noche a 4º C, segundo anticuerpo (anti IgG de conejo en oveja , dilución 1 : 5), 1 hora a temperatura ambiente y PAP (dilución 1 : 50), 1 hora a temperatura ambiente.

Los extendidos de espermatozoides provenientes de túbulos cultivados por espacio de 24 hs., ya sea con suero de conejo normal (SCN) o con suero anti-DE , se incubaron directamente con el segundo anticuerpo. Entre cada incubación se realizaron 3 lavados con buffer Tris. La peroxidasa se visualizó mediante la incubación con 3-3' diamino bencidina (DAB) 0.04 % y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.03 %, durante 7 minutos

a temperatura ambiente y la preparación fue luego deshidratada a través de una serie de diluciones de alcohol.

Cabe aclarar que el suero anti-DE utilizado fue preparado por Garberi y colaboradores (171) inyectando conejos de la raza New Zealand White, con porciones de geles de poliacrilamida conteniendo las proteínas D-E y emulsionadas con adyuvante de Freund completo.

Las diluciones del anti-DE fueron hechas con suero de oveja normal al 1 % en buffer Tris 0.05 M.

El p-formaldehído, la DAB, el  $H_2O_2$  y el PAP también fueron disueltos en buffer Tris.

#### Tratamiento estadístico de los datos.

En todos aquellos estudios en los cuales se compararon porcentajes de fertilidad o número promedio de espermatozoides unidos por ovocito, los resultados fueron analizados mediante el test estadístico de Mann-Whitney (292) mientras que las distribuciones porcentuales de ovocitos conteniendo un número diferente de espermatozoides unidos (0, 1-5, 5-10 o más de 10), se analizaron con el test de  $X^2$  (293).

Los resultados correspondientes al estudio morfométrico fueron analizados mediante el test de Student.

## RESULTADOS

### Primera Parte

En esta primera parte del trabajo se describirán los siguientes puntos:

1. Identificación de proteínas andrógeno-dependientes en el epidídimo del hamster (PE) mediante la estimulación a) in vivo y b) in vitro de la síntesis de PE.
2. Origen y especificidad de PE.
3. Interacción de PE con los espermatozoides.
4. Aparición de PE en función de la edad del animal.
5. Caracterización parcial de PE:
  - a) determinación del peso molecular de PE.
  - b) estudio de la presencia de hidratos de carbono en la composición de PE.

1. Identificación de proteínas epididimarias andrógeno-dependientes (PE).

La identificación de proteínas epididimarias andrógeno-de

pendientes se llevó a cabo a través de dos técnicas diferentes basadas en:

- a) la distinta intensidad de tinción que presentan las bandas proteicas obtenidas por separación electroforética de citosol de epidídimo.
- b) la distinta incorporación de aminoácidos radioactivos a cada una de dichas bandas.

a) El primer paso de este estudio consistió en establecer el perfil de bandas proteicas separadas electroforéticamente de la fracción citosólica del epidídimo de animales normales, el cual se comparó posteriormente con los obtenidos de animales castrados y reinducidos con testosterona.

Se identificaron así, mediante la tinción con azul de Coomassie, una serie de bandas sensibles a la deprivación androgénica, cuyas movilidades relativas a la albúmina (Ra) en geles de poliacrilamida al 10 % resultaron ser: 0.30; 0.35; 0.80; 1.11; 1.21; 1.31; 1.52 y 1.63.

La comparación del perfil obtenido de animales control (Figura 8, gel A) con el obtenido de animales castrados por 15 días (Figura 8, gel B), muestra una disminución en la intensidad de es-



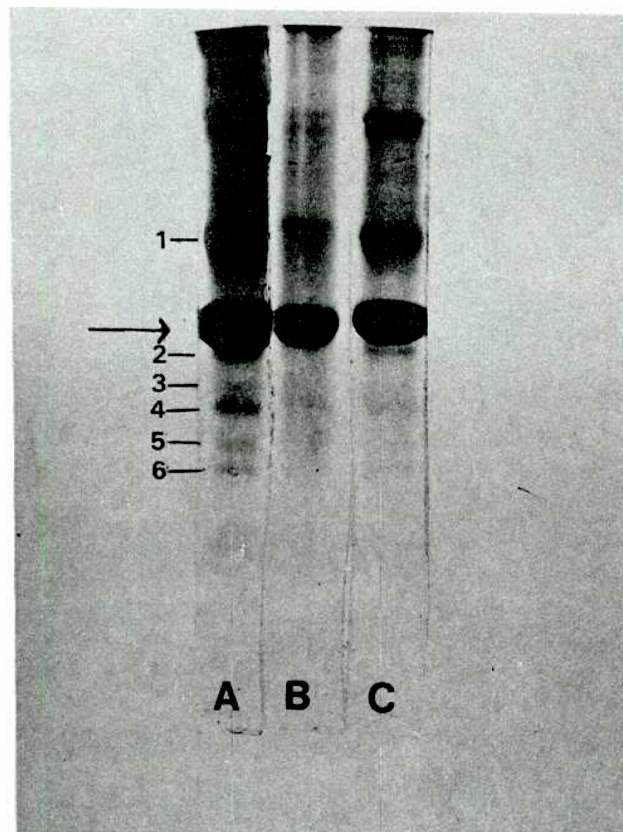


Figura 8: Efecto de la castración y el tratamiento androgénico sobre las proteínas PE<sub>1-6</sub> de epidídimo de hamster. Alícuotas de citosol epididimario (80 ug) fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida al 10 %, los cuales se tiñeron con azul de Coomassie.

A= control    B= castrado por 15 días    C= castrado por 15 días y tratados con 300 ug de Testosterona/día durante 10 días.

La flecha indica la posición de la albúmina.

tas bandas, mientras que la administración de testosterona (300 ug/día, durante 10 días) a animales castrados por 15 días, induce un aumento en la intensidad de las mismas. (Figura 8, gel C).

- b) Con el objeto de investigar si el aumento de estas proteínas en el animal reinducido se debía a una estimulación en la síntesis de las mismas, se efectuaron experimentos de incorporación diferencial de aminoácidos marcados.

Para ello se incubaron los tejidos epididimarios del animal castrado y reinducido por andrógenos con una mezcla de aminoácidos marcados con  $^{14}\text{C}$  y  $^3\text{H}$ , respectivamente. Obtenidos los cito-soles para cada caso, se realizó una co-electroforesis de los mismos en geles de poliacrilamida, analizándose luego la radioactividad asociada a las diferentes proteínas sintetizadas.

Para evaluar el grado de estimulación de una determinada proteína respecto a las restantes, calculamos el siguiente parámetro comparativo:

$$S = \frac{i - \bar{i}}{\bar{i}} \times 100$$

donde  $i$  = índice  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  para una determinada proteína.

$\bar{i}$  = índice  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  promedio de todo el gel.

La Figura 9 esquematiza los picos de reinducción obtenidos como promedio de 9 experimentos, pudiendo observarse el paralelismo existente entre éstos y las bandas proteicas antes mencionadas.

No obstante aparece un pico de  $R_a$  0.40, que no se corresponde con una banda teñible por azul de Coomasie y no se detectan las bandas de  $R_a$ : 0.30 y 0.35 halladas por la técnica de tinción.

En conclusión, las seis bandas que mostraron ser sensibles a la castración y al tratamiento androgénico por ambas técnicas se designaron  $PE_{1-6}$  y presentaron los siguientes  $R_a$ :  $PE_1 = 0.80 \pm 0.03$ ;  $PE_2: 1.10 \pm 0.01$ ;  $PE_3: 1.21 \pm 0.02$ ;  $PE_4: 1.31 \pm 0.01$ ;  $PE_5: 1.52 \pm 0.03$  y  $PE_6: 1.63 \pm 0.02$ .

#### Efecto de diferentes períodos de castración y reinducción sobre la concentración de $PE_{1-6}$ .

Quisimos ver luego que ocurría con la intensidad de las bandas  $PE_{1-6}$  a tiempos mayores de castración y reinducción.

Los tiempos de castración elegidos fueron 7, 15, 30 y 45 días, utilizándose un animal castrado por 30 días para efectuar el tratamiento androgénico durante 5, 15 y 30 días.

Este estudio mostró que la disminución en la intensidad de

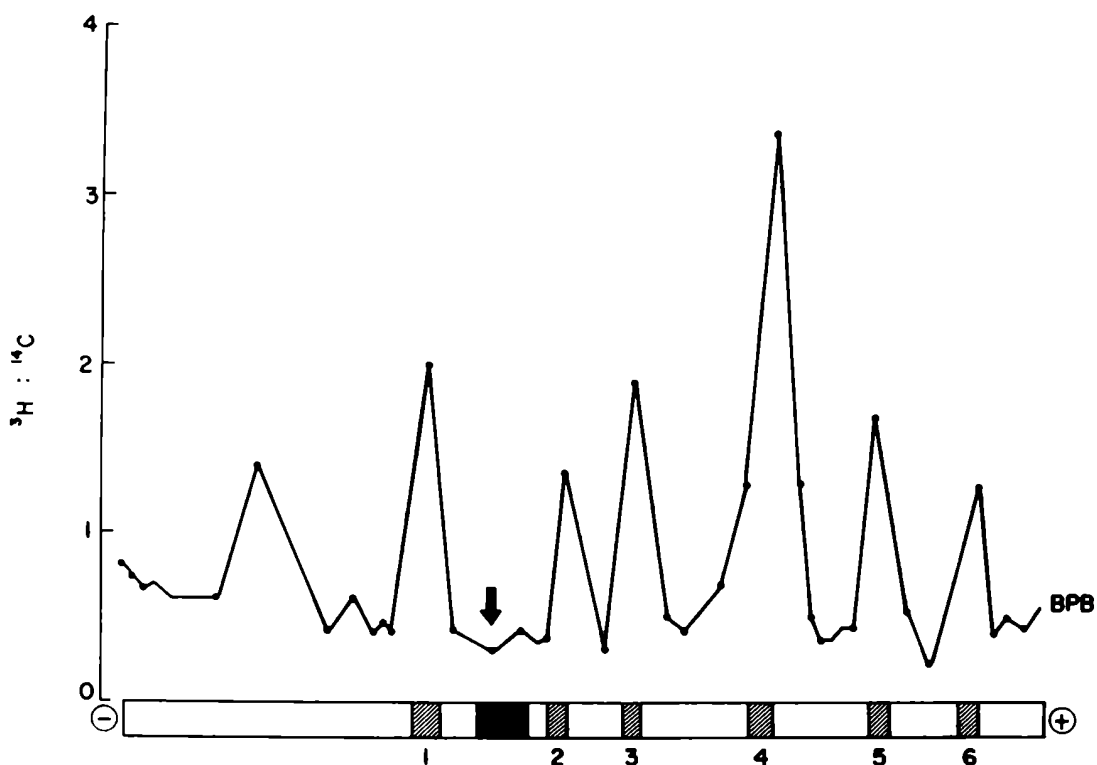


Figura 9: Estimulación androgénica de la síntesis de  $\text{PE}_{1-6}$  in vitro. Alícuotas de 50-100 mg de tejido epididimario proveniente de animales castrados por 15 días o castrados por 15 días y reinducidos con T los últimos 10 días, se incubaron durante 3 hs. y a  $31^{\circ}\text{C}$  con  $15\ \mu\text{ci}$  de una mezcla de aminoácidos marcados con  $^{14}\text{C}$  o con  $40\ \mu\text{ci}$  de una mezcla de aminoácidos marcados con  $^3\text{H}$  respectivamente. Finalizada la incu -

bación se prepararon las fracciones citosólicas de cada tejido y una mezcla de 80 ul de cada citosol fue sometida a una coelectroforesis en geles de poliacrilamida al 10 %. Los geles se tifieron o cortaron en fracciones de 1 mm de espesor, se determinó la radioactividad incorporada a cada una de las fracciones y finalmente se calculó el índice  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  para cada una de ellas.

La flecha indica la posición de la albúmina. BPB=azul de bromofenol.

las bandas, producida por la castración se manifiesta a los 7 días después de la orquidectomía (Figura 10, gel A), haciéndose más notoria a los 15 y 30 días (Figura 10, geles B y C) para finalmente desaparecer a los 45 días de castración.

Mientras el efecto de la castración parece ser uniforme para todas las bandas, el tratamiento con testosterona por 10 y 15 días a animales castrados por 30 días, aumenta la intensidad de las bandas  $PE_1$ ,  $PE_2$  y  $PE_4$  más rápidamente que las bandas  $PE_3$ ,  $PE_5$  y  $PE_6$ . (Figura 10, geles D y E), lo cual estaría de acuerdo con la mayor incorporación de radioactividad encontrada anteriormente en los picos correspondientes a las  $PE_1$ ,  $PE_3$  y  $PE_4$ .

La administración de andrógenos por períodos más largos (30 días) no aumentó los niveles de reinducción. (Figura 10, gel F).

El siguiente paso consistió en calcular en forma cuantitativa los cambios observados luego de efectuadas la castración y posterior reinducción androgénica. Para tal fin se realizó una densitometría a 550 nm, de los geles de citosol de animal normal, castrado por 15 días y reinducido por 10 días.

Los resultados indicaron una bajada de aproximadamente un 40 % en el contenido de  $PE_{1-6}$  debido a la castración, y una re -

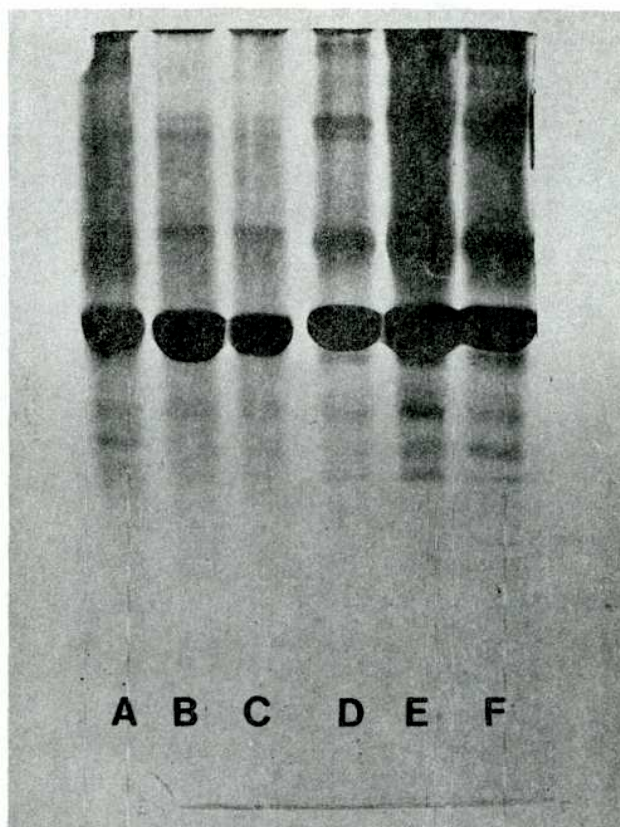


Figura 10: Efecto de los diferentes períodos de castración y tratamiento androgénico, sobre las proteínas  $PE_{1-6}$ .

- A= castrado por 7 días
- B= castrado por 15 días
- C= castrado por 30 días
- D= castrado por 30 días y tratado con 300 ug de T/día durante 10 días
- E= castrado por 30 días y tratado con T durante 15 días
- F= castrado por 30 días y tratado con T durante 30 días

cuperación del 90 % luego del tratamiento con la hormona. La Figura 11 muestra los perfiles obtenidos cuando los geles de citosol normal (A) y castrado por 15 días (B), se sometieron a la técnica.

## 2. Estudios de origen y especificidad de las proteínas PE<sub>1-6</sub>.

Existía la posibilidad de que estas proteínas tuvieran su origen en el testículo llegando al epidídimo a través del fluido testicular, lo cual podría explicar entonces la bajada en su concentración producida por la castración.

Para descartar esta probabilidad se preparó un citosol a partir de homogenato testicular, cuyo perfil electroforético se comparó con el correspondiente al citosol control.

Los resultados obtenidos muestran la presencia de dos bandas en el citosol de testículo (Figura 12, gel B) con la misma movilidad relativa que las PE<sub>1</sub> y PE<sub>4</sub> de citosol normal (Figura 12, gel A) estando completamente ausentes las restantes proteínas. En la misma figura se observa el gel de suero de animal normal (Figura 12, gel C), que al igual que en músculo e hígado (no incluidos en la foto), no presenta ninguna de las bandas en cuestión.



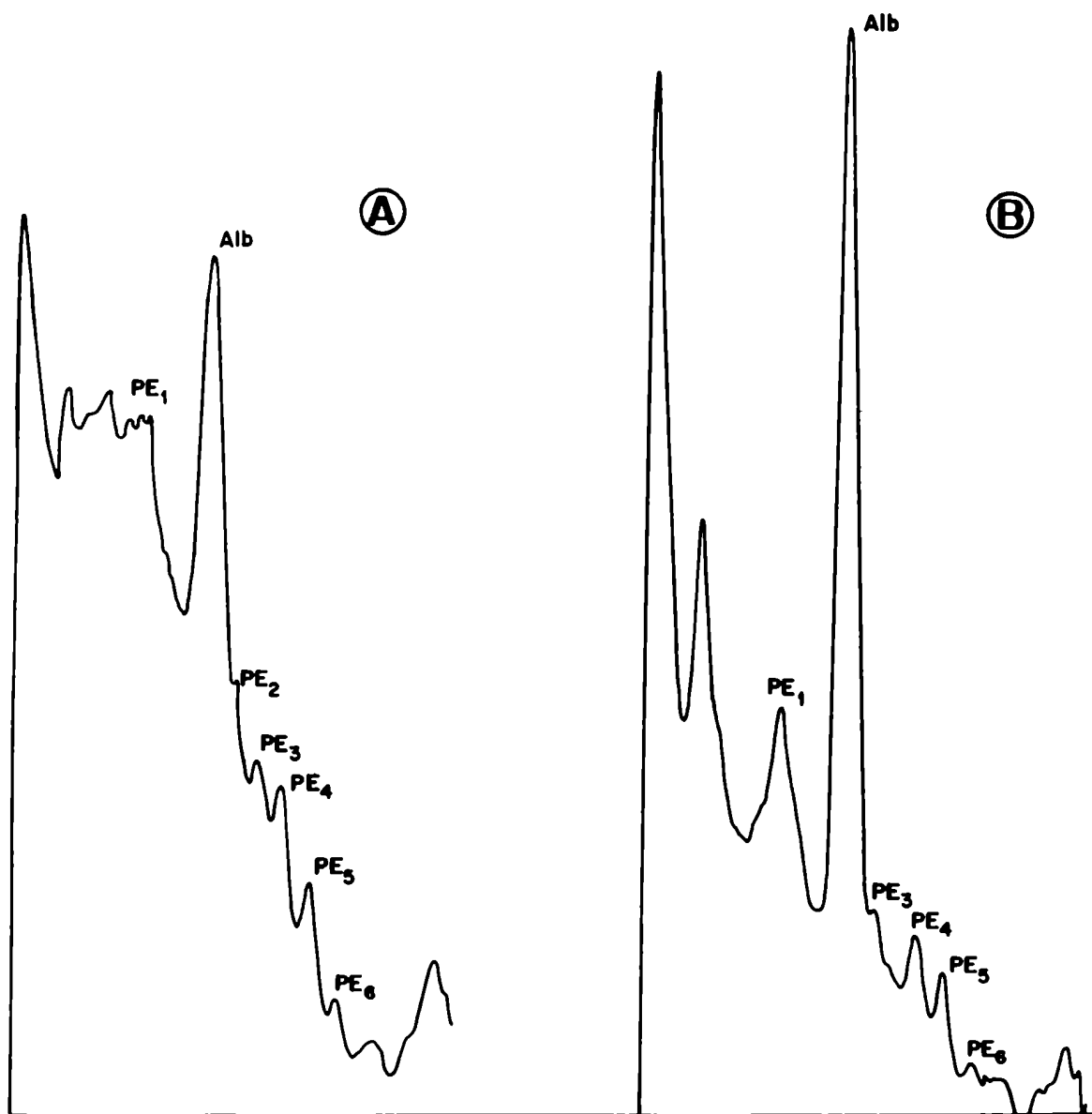


Figura 11: Análisis densitométrico de las bandas proteicas provenientes de la electroforesis de un citosol epididimario de animal normal (A) y castrado por 15 días (B).

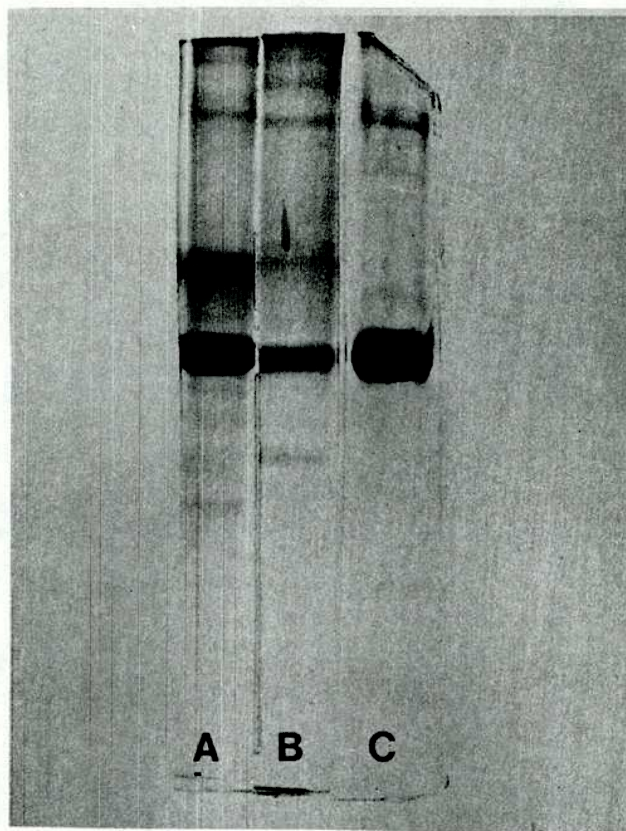


Figura 12: Comparación de las bandas proteicas de:

A: citosol de epidídimo , B: citosol de testículo y

C: suero sanguíneo de hamster.

Por su parte, los geles correspondientes a los citosoles de próstata y vesículas seminales mostraron 2 bandas cuyos  $R_f$  fueron cercanos, aunque no coincidentes, con los hallados para  $PE_2$  y  $PE_4$ .

Con el fin de saber si las proteínas  $PE_{1-6}$  eran o no secretadas a la luz del túbulo epididimario, se analizaron muestras de fluido extraído de la cola del órgano, encontrándose presentes en el mismo 3 bandas cuyos  $R_f$  coincidieron con las proteínas  $PE_1$ ,  $PE_3$  y  $PE_4$  sintetizadas por el tejido.

### 3. Interacción de las proteínas $PE_{1-6}$ con los espermatozoides.

Los estudios destinados a investigar una posible interacción de  $PE_{1-6}$  con los espermatozoides epididimarios, se llevaron a cabo examinando la presencia de estas proteínas sobre la superficie de los mismos.

Para ello se tomaron muestras de espermatozoides testiculares y provenientes de diferentes segmentos del epidídimo, a los cuales se les extrajeron las proteínas de superficie mediante tratamiento salino con solución de NaCl 0.25 o 0.5 M.

Los resultados indicaron la ausencia de las bandas correspondientes a  $PE_{1-6}$  entre las proteínas extraídas de espermatozoides

de testículo o de los segmentos epididimarios proximales (cabeza y cuerpo proximal), ya sea utilizando NaCl 0.25 o 0.5 M.

No obstante, luego de cualquiera de ambos tratamientos, los espermatozoides de cuerpo y cola distal del epidídimo presentaron cantidades apreciables de PE<sub>2</sub> y PE<sub>3</sub> las cuales, analizadas a través de la técnica de densitometría representaron un 60 % de las proteínas totales extraídas con el tratamiento salino.

En la Figura 13 (gel A), se muestran las bandas PE<sub>1-6</sub> de un citosol normal, contra el cual se comparan una serie de extractos proteicos de espermatozoides provenientes de cuatro machos diferentes (Figura 13, geles B, C, D y E).

Puede verse en todos los casos la presencia de dos bandas cuyos Ra coincidieron con los de las proteínas PE<sub>2</sub> y PE<sub>3</sub>, lo cual estaría indicando su posible asociación a la superficie de los espermatozoides. Sin embargo, la banda correspondiente a PE<sub>2</sub> se presenta en forma cuantitativamente diferente, mostrando una contribución mucho mayor para el caso de los espermatozoides que para el del citosol normal utilizado como control.

La gran abundancia de PE<sub>2</sub> eluída de espermatozoides de la cola epididimaria como así también su Ra cercano al correspondiente Ra de la albúmina, nos llevó a pensar que podríamos estar en pre-

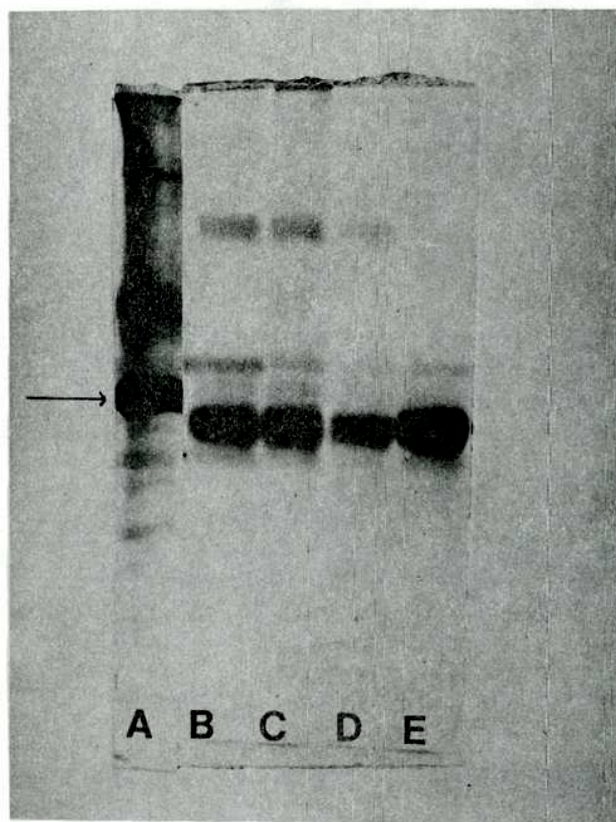


Figura 13: Comparación de las bandas proteicas de un citosol epididimario (A) y de los extractos proteicos provenientes de espermatozoides de la cola distal del epidídimo de 4 animales diferentes (B-E).

La flecha indica la posición de la albúmina.

sencia de albúmina modificada por el tratamiento salino al que fueron expuestos los espermatozoides. Para descartar esta teoría se procedió a efectuar el tratamiento salino sobre citosol normal, incubándose al mismo durante 20 minutos con una solución de NaCl 0.25 o 0.5 M.

A través de los resultados obtenidos concluimos que el perfil para las proteínas extraídas de espermatozoides no era un mero producto de la técnica empleada, ya que luego del tratamiento salino no pudieron observarse diferencias en el Ra de la albúmina del citosol,

Existía aún la posibilidad de que la acción de una enzima proteolítica del acrosoma del espermatozoide, liberada durante la extracción salina, alterase de alguna manera la movilidad electroforética de la albúmina.

Para ello se extrajeron los espermatozoides en un buffer 0.25 M en NaCl, conteniendo un inhibidor de tripsina, con el fin de impedir la acción de la enzima acrosomal. Por los resultados obtenidos, nuevamente descartamos una alteración de la albúmina por este mecanismo.

#### 4. Aparición de las proteínas epididimarias PE<sub>1-6</sub> en función de la edad.

Teniendo en cuenta la posible asociación de  $PE_2$  y  $PE_3$  a la superficie de los espermatozoides, consideramos que sería de interés realizar un estudio de la aparición de las mismas en el epidídimo en función de la edad del animal, con el fin de correlacionar dicha aparición con el estado funcional del órgano.

Se utilizaron para ello animales de seis edades diferentes: 23 y 30 días (prepúberes), 35, 45 y 60 días (púberes) y 90 días (adultos), a partir de los cuales se hicieron citosoles de epidídimo entero, procediéndose luego a la separación proteica mediante la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida al 10 %.

La Figura 14 muestra el perfil obtenido luego de la tinción con azul de Coomasie, donde podemos observar que cinco ( $PE_{1-5}$ ) de las seis proteínas estudiadas, se encuentran presentes en todas las edades. Es importante destacar que si bien recién encontramos espermatozoides en el epidídimo proveniente del animal de 45 días de edad,  $PE_2$  y  $PE_3$  ya se detectaron desde las primeras edades, lo cual estaría indicando que la síntesis de dichas proteínas precedería a la llegada de espermatozoides al órgano.

También podemos observar que tanto la  $PE_6$  como una proteína de  $R_a: 0.92$ , comienzan a detectarse recién en el animal de 45

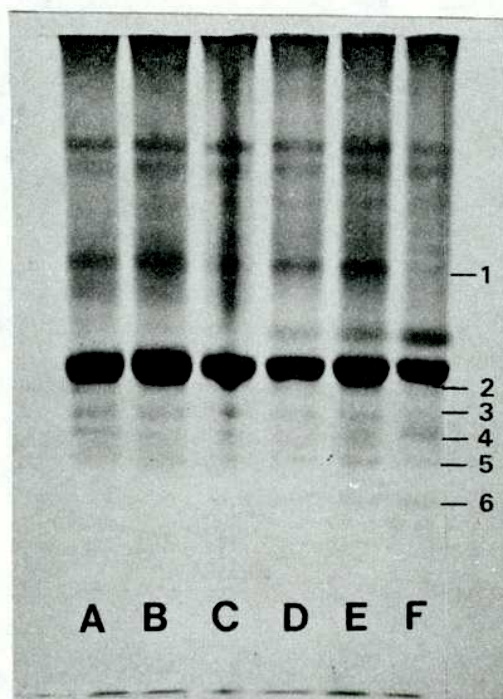


Figura 14: Estudio de la presencia de  $PE_{1-6}$  en función de la edad del animal

A= 23 días B= 30 días C= 35 días D= 45 días E= 60 días y

F= 90 días.



días de edad, para hacerse finalmente notorias en la edad adulta, coincidiendo entonces la aparición de estas 2 proteínas con la llegada de espermatozoides al epidídimo.

##### 5. Caracterización parcial de las proteínas PE<sub>1-6</sub>.

Al no poseer aún un extracto purificado de las proteínas PE<sub>1-6</sub>, procedimos a realizar una caracterización tan sólo parcial de las mismas, la cual se limitó a la determinación de sus pesos moleculares y al estudio de la presencia de hidratos de carbono en la composición de las mismas.

a) Determinación del peso molecular de PE<sub>1-6</sub>: El estudio del peso molecular se llevó a cabo a través del análisis de regresión lineal de Ferguson, para lo cual, tal como se indica en Materiales y Métodos, se utilizaron geles de distinta concentración de poliacrilamida (7.5 %, 10 %, 12 % y 14 %), en todos los cuales se sembró una muestra de citosol normal. Las sustancias elegidas como patrones internos fueron: Albúmina sérica bovina (BSA) PM: 67000, Ovoalbúmina (OA) PM: 43500 e inhibidor de tripsina del poroto de soja (SBTI) PM: 22700.

En la Figura 15 se muestra un gráfico de peso molecular (PM) en función del coeficiente de retardación (Kr), (el cual depende directamente de la concentración de acrilamida utilizada), donde pueden observarse las posiciones que ocupan los patrones como así también las de las seis bandas proteicas en cuestión. Los pesos moleculares hallados mediante este método fueron: PE<sub>1</sub>: 61400, PE<sub>2</sub>: 42500, PE<sub>3</sub>: 23800, PE<sub>4</sub>: 20400, PE<sub>5</sub>: 26100 y PE<sub>6</sub>: 41000.

- b) Estudio de la presencia de hidratos de carbono: De acuerdo a los conocimientos que existen acerca de proteínas epididimarias secretorias andrógeno-dependientes en distintas especies, había grandes posibilidades de que PE<sub>1-6</sub> fueran en realidad glicoproteínas.

Para confirmar esta teoría se utilizó el ensayo de tinción de PAS con reactivo de Schiff-ácido periódico, el cual resultó positivo para las seis bandas estudiadas, indicando la naturaleza glicoproteica de las mismas.

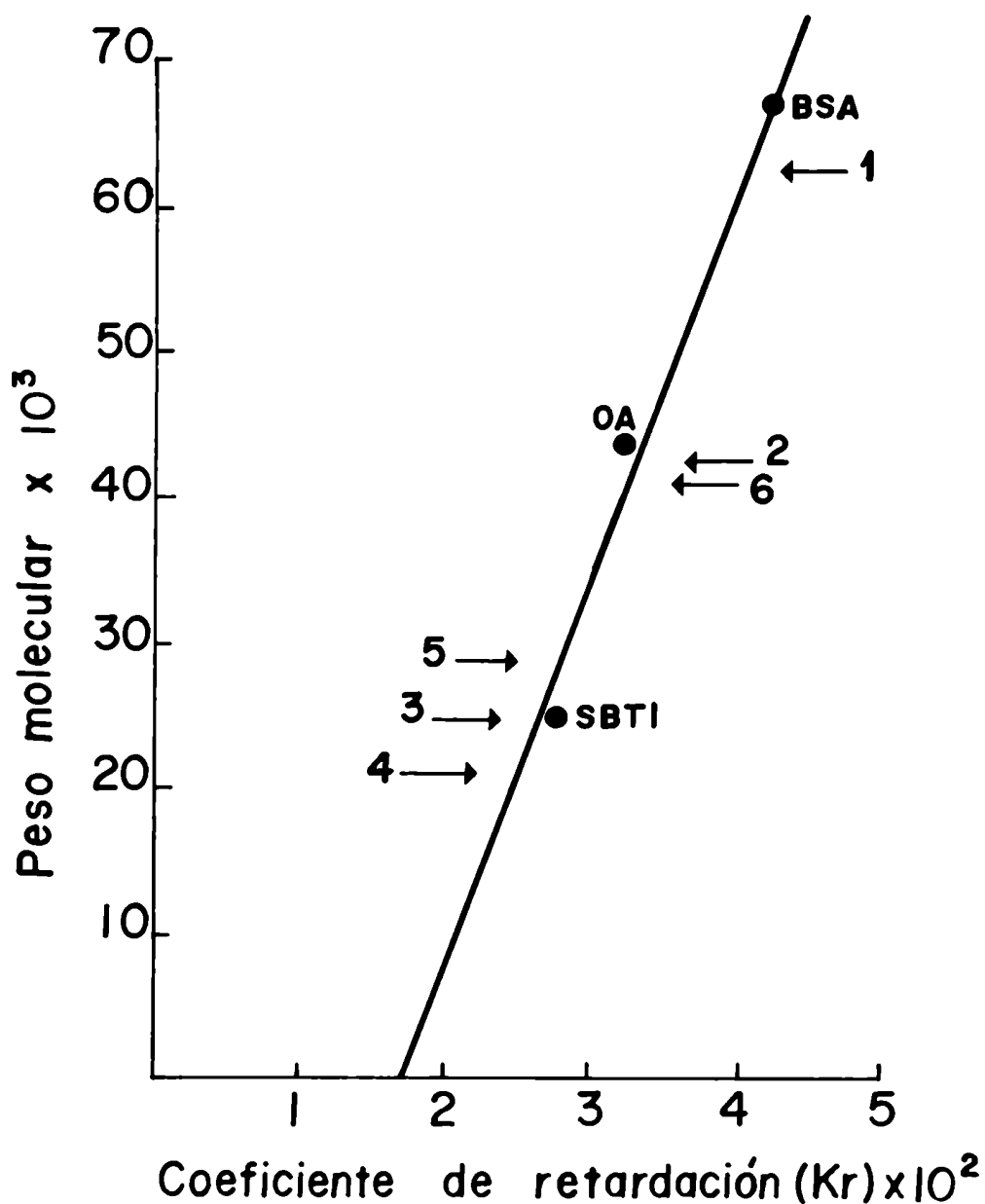


Figura 15: Determinación del PM de  $PE_{1-6}$  según el método de regresión lineal.

Los patrones utilizados fueron BSA (PM:67000), OA (PM:43500) y SBTI (PM:22700). Las flechas indican la posición de cada una de las proteínas  $PE_{1-6}$ . Los valores obtenidos representan el promedio de 3 determinaciones diferentes. El coeficiente de la recta es  $r = 0.988$ .

## Segunda Parte

Como mencionáramos anteriormente, el objetivo final de este trabajo ha consistido en estudiar el papel biológico que cumplen las glicoproteínas andrógeno-dependientes dentro del proceso de maduración y más específicamente en lo que respecta a la adquisición de capacidad de reconocimiento y capacidad fertilizante por parte del espermatozoide.

Los puntos que describiremos en esta segunda parte de resultados son los siguientes:

I) desarrollo de los ensayos biológicos con los cuales se evalúa:

- a) la capacidad de unión de espermatozoides a la zona pelúcida del ovocito.
- b) la capacidad del espermatozoide para penetrar y fertilizar al ovocito.

II) determinación, a través de los ensayos a y b, del grado de maduración de espermatozoides provenientes de los distintos segmentos del epidídimo, con el fin de identificar la población más indicada para estudiar el efecto de factores madurantes.

III) desarrollo de un sistema de cultivo de órgano que permita mantener la motilidad y viabilidad de los espermatozoides contenidos dentro de los túbulos epididimarios.

IV) determinación de la participación de proteínas epididimarias en el proceso de maduración de los espermatozoides, evaluando la capacidad de reconocimiento y/o fertilización que presentan los mismos luego del agregado de los diversos factores al medio de cultivo.

I) Desarrollo de los ensayos biológicos

a) Ensayo de unión de espermatozoides a la zona pelúcida .

Este ensayo, en el cual se determina el número de espermatozoides unidos a la zona pelúcida de un ovocito, permite evaluar una de las propiedades fundamentales de un espermatozoide, como lo es su capacidad de reconocer al ovocito.

Sin embargo, es importante aclarar que la validez de esta técnica está basada en la cuantificación de sólo aquellos espermatozoides unidos en forma específica a la zona pelúcida, ya que tal como se describiera en la introducción, los espermatozoides de mamíferos presentan una primera etapa de interacción débil y reversible duran-

te la cual pueden ser removidos de la zona pelúcida por sucesivos lavados (adhesión) y una segunda etapa de unión irreversible e incluso estable a los numerosos lavados (unión).

Puesto que tanto la adhesión como la unión han sido definidas en base a operaciones metodológicas (243), es común encontrar variaciones cuantitativas entre los diversos laboratorios que utilizan estos ensayos.

Por tal razón nuestros primeros experimentos se realizaron con el objeto de establecer las condiciones necesarias para verificar y distinguir ambos tipos de interacción.

Para ello incubamos durante 40' y a 37° C, una suspensión de espermatozoides provenientes de la cola distal del epidídimo (T<sub>2</sub>), con ovocitos enteros obtenidos a partir de un cúmulus previamente tratado durante 5 minutos con solución de hialuronidasa.

Finalizada la incubación, algunos ovocitos fueron retirados y directamente observados al microscopio óptico, mientras que otros fueron sometidos a tres lavados sucesivos en solución fisiológica y recién luego examinados al microscopio.

Pudimos observar entonces que aquellos ovocitos que no habían sido previamente lavados, presentaban un gran número de espermatozoides unidos a la zona pelúcida pero sólo en forma tempo-

ral, ya que luego de 5 a 10 minutos la mayoría de los mismos se ha  
bía disociado. (unión inespecífica).

Por su parte los ovocitos previamente lavados presenta-  
ban una menor cantidad de espermatozoides unidos que permanecían  
asociados a la zona pelúcida aún luego de varias horas. (unión espe-  
cífica).

De acuerdo a estos resultados y para lograr una mayor re  
producibilidad del ensayo, concluimos que la determinación del núme-  
ro de espermatozoides unidos debía llevarse a cabo siguiendo el se-  
gundo esquema experimental.

Dado que la unión de los espermatozoides a la zona pelúci-  
da de los ovocitos es en parte un reflejo de la frecuencia de colisio-  
nes entre dichas gametas, la motilidad inicial de los espermatozoides  
se convierte en uno de los principales factores que deben ser consi-  
derados al realizar estos ensayos.

Para validar la comparación entre los resultados obtenidos  
con las distintas poblaciones de espermatozoides, decidimos realizar  
estas incubaciones bajo una agitación mecánica suave (50 oscilaciones  
por minuto), que nos permitió independizar nuestras conclusiones del  
factor motilidad.

Finalmente pudimos observar que la unión de espermatozoi

des a la zona pelúcida también dependía del procedimiento empleado en la preparación previa de los ovocitos.

Ningún espermatozoide al cabo de 40 minutos de interacción, logró unirse a la zona pelúcida de los ovocitos cuando los mismos se encontraban rodeados de las células del cúmulus.

Si bien los espermatozoides ya fueron capaces de unirse a ovocitos liberados de las células del cúmulus por acción de hialuronidasa, observamos que la unión se incrementaba notoriamente cuando los cúmulus o bien los ovocitos libres eran incubados durante aproximadamente 2 horas y recién luego puestos en contacto con los espermatozoides.

b) Determinación de la capacidad fertilizante de los espermatozoides.

Para evaluar la capacidad fertilizante de un espermatozoide es fundamental definir previamente el criterio de fertilidad con el cual se examinarán los ovocitos fecundados.

Por tal razón realizamos un primer estudio que consistió en observar los distintos estadios de fertilización que presentaban los ovocitos en función del tiempo transcurrido a partir del momento de la inseminación.

Es conveniente aclarar que nos referiremos a un ovocito como "penetrado", cuando el espermatozoide se encuentra en el es-



pacio perivitelino del mismo y como "fertilizado" cuando ya el ovocito presenta dos pronúcleos y espermatozoide en su citoplasma celular.

La Tabla II resume entonces los distintos estadios y porcentajes de penetración y/o fertilización encontrados para cada horario.

Si bien de acuerdo a los resultados obtenidos y a los criterios de fertilización comunmente utilizados, cualquiera de los horarios ensayados parecía tener validez, la observación de los ovocitos se realizó finalmente a las 17 hs. luego de la inseminación por ser este horario no sólo accesible para el operador sino aquel que presentaba el 100 % de los ovocitos "fertilizados" y en un mismo estadio (2 pronúcleos y cola de espermatozoide). Otro horario de observación que ofrecía aparentemente las mismas ventajas era el correspondiente a las 24 hs. posteriores a la inseminación (100 % de clivaje celular), sin embargo es importante destacar que a partir de este horario y en adelante, comenzaba a hacerse muy notorio el porcentaje de ovocitos que habían sufrido partenogénesis.

Este fenómeno, descripto sólo para mamíferos, puede definirse como la tendencia de los ovocitos no fertilizados a desarrollarse espontáneamente en ausencia de la gameta masculina (294).

Tabla II

Estadíos de fertilización correspondiente a ovocitos de hamster observados a diferentes tiempos luego de la inseminación.

Espermatozoides de la cola distal del epidídimo fueron inseminados in vivo en hembras prepúberes previamente superovuladas. Los ovocitos se recuperaron al cabo de los períodos señalados y se examinaron (sin fijar) al microscopio óptico. Los porcentajes de penetración y/o fertilización obtenidos están referidos al total de ovocitos fecundados.

Tiempos de observación (hs.)	Estadíos encontrados	% de penetración y/o fertilización
10-12	espermatozoide en espacio perivitelino	100
15	espermatozoide en espacio perivitelino 2 pronúcleos y cola de espermatozoide en el citoplasma celular	10 90
17	2 pronúcleos y cola de espermatozoide en el citoplasma celular	100
21	2 pronúcleos y cola de espermatozoide en el citoplasma celular clivaje celular	80 20
24	clivaje celular	100

La gran cantidad de ovocitos con 1 ó 2 pronúcleos que puede obtenerse luego de la sola inseminación de medio BMOC, es sin lugar a dudas la corroboración más definitiva de la existencia de este fenómeno.

Dado que los ovocitos "partenogenizados" son especialmente parecidos a los ovocitos fecundados excepto por la falta de espermatozoide, se hace imprescindible el empleo de un criterio de fertilización como el que hemos seleccionado, en el cual se incluye la presencia del espermatozoide en el citoplasma celular.

## II) Perfiles de maduración.

Teniendo en cuenta que nuestro objetivo consistió en estudiar el efecto de factores madurantes, tanto sobre la capacidad de reconocimiento como sobre la capacidad fertilizante de un espermatozoide, decidimos evaluar el grado de maduración que presentan los espermatozoides de los distintos segmentos epididimarios, con el fin de identificar la población más adecuada para cada estudio. Estos espermatozoides debían ser lo suficientemente inmaduros como para ser susceptibles a las modificaciones impuestas por el tratamiento, sin llegar a niveles tales que nos impidiesen utilizarlos como controles internos en los diversos ensayos.

a) Perfil epididimario de capacidad de reconocimiento y unión al ovocito.

Para ello se utilizaron espermatozoides recién obtenidos de los distintos segmentos epididimarios (H, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y T<sub>2</sub>), los cuales se pusieron en contacto durante 40 minutos con ovocitos provenientes de un cúmulus previamente incubado durante 2 horas a 37° C contándose finalmente el número de espermatozoides unidos en forma específica a cada uno de ellos.

La agitación mecánica durante la incubación resulta ser imprescindible en este tipo de estudio comparativo, en vista del diferente grado de motilidad que presentan los espermatozoides de las distintas regiones del epidídimo.

Los resultados obtenidos y resumidos en la Tabla III se expresan como el porcentaje de ovocitos que presentan 0, 1-5, 5-10 o más de 10 espermatozoides unidos, agregándose para aquellos casos en que fuera posible, el número promedio de espermatozoides unidos por ovocito.

Puede observarse que el 100% de los ovocitos incubados con espermatozoides de la cabeza epididimaria (H) no presentaron ningún espermatozoide unido a la zona pelúcida, lo cual estaría indicando la incapacidad de dichos espermatozoides de reconocer y u-

Tabla III

Capacidad de unión a zona pelúcida de espermatozoides provenientes de diferentes segmentos del epidídimo de hamster.

Segmento epididimario	Nº total de ovocitos	Nº (%) de ovocitos con				Nº Promedio de esp/ovocito ± ES
		0	1-5	5-10	>10	
cabeza	40	40(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0
cuerpo proximal	56	34(61)	14(25)	8(14)	0(0)	1.95 ± 0.51
cuerpo distal	36	6(17)	0(0)	6(16)	24(67)	> 20
cola distal	28	0(0)	0(0)	0(0)	28(100)	> 20

Alícuotas de una suspensión de espermatozoides recuperados de los distintos segmentos del epidídimo ( $10^7$  cel/ml) se incubaron con ovocitos libres de células del cúmulus, durante 40 minutos con agitación suave y a 37° C. Finalizada la incubación se determinó el número de espermatozoides que permanecían firmemente unidos a la zona pelúcida de los ovocitos, aún luego de 3 pasajes sucesivos de los mismos a través de una fina pipeta Pasteur.

nirse al ovocito.

La capacidad de reconocimiento recién comienza a evidenciarse en el cuerpo proximal ( $B_1$ ), donde algunos ovocitos (25 %) presentaron de 1-5 espermatozoides unidos y otros (14 %) entre 5 y 10, y aumenta abruptamente al pasar al cuerpo distal ( $B_2$ ), alcanzando valores muy cercanos a los hallados para la cola epididimaria. (67% y 100 % de ovocitos con más de 10 espermatozoides unidos respectivamente).

Esta variación también se ve reflejada en el número promedio de espermatozoides unidos por ovocito, cuyo valor fue 0 para la cabeza y  $1.95 \pm 0.51$  para el cuerpo proximal, aumentando a más de 20 para el cuerpo y cola distal.

Teniendo en cuenta que los espermatozoides del cuerpo distal del epidídimo ya presentan la capacidad de unión de un espermatozoide maduro, seleccionamos al cuerpo proximal ( $B_1$ ) como el segmento más adecuado para ensayar el efecto de factores madurantes sobre la capacidad de reconocimiento del espermatozoide.

b) Perfil epididimario de capacidad fertilizante.

Este estudio se llevó a cabo determinando la capacidad fertilizante de los espermatozoides de distintos segmentos del epidídimo,

luego de haber sido inseminados artificialmente in vivo.

Para ello las suspensiones de espermatozoides correspondientes a los segmentos H, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y T<sub>1</sub> se inseminaron en uno de los cuernos uterinos de la hembra, colocándose en el cuerno contralateral, la suspensión de espermatozoides del segmento T<sub>2</sub> utilizada como control.

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla IV e indican un aumento de la capacidad fertilizante de los espermatozoides epididimarios en sentido cefalo-caudal. Mientras los espermatozoides de cabeza y cuerpo proximal se mostraron totalmente incapaces de fertilizar a un ovocito (0 %), los espermatozoides del cuerpo distal presentaron un porcentaje de fertilidad del 13 %, que se eleva bruscamente en el segmento posterior ( T<sub>1</sub> ) hasta alcanzar un valor (73 %) que no difiere significativamente de aquel obtenido con espermatozoides completamente maduros de la cola distal (89 %).

En vista de estos resultados, decidimos que el cuerpo distal era una región de transición y por lo tanto la más apropiada para estudiar la acción de factores madurantes sobre la capacidad fertilizante del espermatozoide.

El diseño experimental antes descrito se aplicó tanto al epidídimo izquierdo como al epidídimo derecho de cada animal, ob-



Tabla IV

Capacidad fertilizante de espermatozoides provenientes de los diferentes segmentos del epidídimo.

Segmento	n	epidídimo izquierdo	epidídimo derecho
cabeza	6	0/60 <sup>a</sup> (0) <sup>b</sup>	0/44(0)
cuerpo proximal	10	0/57(0)	0/64(0)
cuerpo distal	22	20/152(13)	18/138(13)
cola proximal	20	88/121(73)	119/168(71)
cola distal	58	209/235(89)	222/262(85)

a= Nº de ovocitos fertilizados / Nº total de ovocitos recuperados.

b= porcentaje de fertilización.

Alícuotas de una suspensión ( $10^7$  cel/ml) de espermatozoides de H, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> o T<sub>1</sub>, se inseminaron en uno de los cuernos uterinos de cada hembra, colocándose en el cuerno contralateral, una suspensión de espermatozoides de T<sub>2</sub> utilizada como control. El mismo procedimiento se repitió para los epidídimos izquierdo y derecho de cada animal.

En todos los casos los ovocitos se recuperaron y examinaron al microscopio óptico 17 hs. luego de la inseminación, calculándose los porcentajes de fertilización obtenidos.

teniéndose resultados (Tabla IV) que por su coincidencia estarían indicando un avance sincrónico en la maduración de los espermatozoides de ambos órganos. Por otro lado, estos resultados nos dan una medida del grado de reproducibilidad de la técnica empleada, permitiéndonos a la vez utilizar a cada epidídimo como control de su contralateral.

### III) Desarrollo del sistema de cultivo.

Los espermatozoides mantenidos fuera de su entorno epididimario alcanzan un período de sobrevivencia que puede ser estimado en horas, mientras que permaneciendo dentro del túbulo epididimario pueden llegar a mantenerse móviles y viables por espacio de varios días.

Los resultados que describiremos a continuación forman parte de un estudio cuyo objetivo consistió precisamente en desarrollar un sistema de cultivo de órgano que permitiera mantener la integridad del tejido epididimario y la motilidad y viabilidad de los espermatozoides contenidos.

En una primera etapa del estudio, las condiciones más adecuadas del sistema de cultivo se establecieron comparando la motilidad de espermatozoides maduros ( $T_2$ ) provenientes de un túbulo

cultivado, respecto de la de aquellos recuperados del mismo segmento de un órgano recién extraído.

La Tabla V resume los resultados obtenidos, señalando el grado de motilidad observado en función de los diversos diseños experimentales ensayados. Comenzamos estudiando el efecto de la preincubación del tejido epididimario, previamente disecado, en una solución de enzima proteolítica capaz de remover el tejido conectivo remanente y facilitar el desarrollamiento del túbulo. Para ello utilizamos solución de colagenasa en un rango de concentraciones del 0.05% al 0.5 % durante diversos tiempos de incubación que oscilaron entre 2 y 15 minutos.

Pudimos observar que si bien esta enzima lograba en todos los casos remover el tejido conectivo, afectaba en forma simultánea la integridad de los túbulos y la motilidad de los espermatozoides recuperados.

La alta sensibilidad de los túbulos epididimarios al tratamiento enzimático nos llevó a recurrir a la separación mecánica de los mismos, la cual se efectuó bajo lupa y con ayuda de material de cirugía, prestando especial atención en no dañar el tejido y provocar la liberación de espermatozoides al medio.

Sin embargo, a pesar de un cuidadoso manipuleo, este últio

Tabla V

Efecto de diversas condiciones de cultivo sobre la motilidad de espermatozoides de la cola distal del epidídimo de hamster.

Túbulos de la cola distal del epidídimo se cultivaron durante 24 hs. bajo diversas condiciones experimentales. Finalizado el cultivo, los espermatozoides se liberaron en medio BMOC a 37° C y una alícuota de cada suspensión se examinó inmediatamente al microscopio óptico.

El grado de motilidad de los espermatozoides se evaluó de acuerdo al siguiente criterio:

- sin motilidad
- + motilidad in situ
- ++ motilidad de mediana intensidad con desplazamientos leves
- +++ motilidad intensa y en parte progresiva
- ++++ máxima motilidad: muy intensa y totalmente progresiva

condiciones ensayadas				Grado de motilidad de los espermatozoides al cabo de 24 hs. de cultivo
tratamiento de los túbulos	enzimático (colagenasa)	conc (%)	tiempo	
		0.5 0.05	2 y 15 min	
	quirúrgico	túbulo sin decapsular túbulo decapsulado túbulo decapsulado y desenrollado túbulo decapsulado, desenrollado y ligado		+ ++ +++ ++++
medio de cultivo		BMOC 199 (Earle) 199 (Earle) + SFB (1 %) 199 (Earle) + PE (10 %)		+++(*) ++++ ++++ ++++
atmósfera gaseosa		aire aire (95%) y CO <sub>2</sub> (5%) O <sub>2</sub> (95%) y CO <sub>2</sub> (5%)		- + ++++
Temperatura		33° C 37° C		++++ ++++

\* A tiempos mayores de 24 hs, el medio salino BMOC ya no fué capaz de mantener la motilidad de los espermatozoides.

mo inconveniente se presentaba comunmente al intentar decapsular los túbulos de cola distal, debido a la gran cantidad de espermatozoides almacenados en esta región.

La salida de espermatozoides al medio a través de los extremos del túbulo, pudo resolverse en cambio utilizando ligaduras terminales.

Luego de 24 horas de cultivo, los espermatozoides de los túbulos así tratados, presentaron una motilidad que no difería respecto de los espermatozoides control. Si bien en un principio el explanto se ubicaba sobre una lámina de ágar colocada a su vez sobre un soporte de acero inoxidable, optamos por colocarlo directamente sobre la grilla metálica, debido a que el empleo del ágar no representaba ninguna ventaja adicional.

Tanto el medio completo 199 (Earle), como el medio salino BMOC, fueron capaces de mantener la motilidad de los espermatozoides luego de 24 horas de cultivo. Para períodos más largos (48-72 hs.), en cambio, observamos que aquellos espermatozoides provenientes del túbulo cultivado en medio 199 (Earle), presentaban una mejor motilidad. El agregado de suero fetal bovino (adsorbido con carbón), al medio de cultivo, no modificó el mantenimiento de motilidad obtenido en ausencia del mismo, de modo tal que su incorpora

ción no fué necesaria.

La posible contaminación de los cultivos se contrarrestó mediante el agregado de una mezcla de penicilina-estreptomicina, que no afectó en absoluto la motilidad de los espermatozoides.

Posteriormente se ensayaron diferentes temperaturas y fases gaseosas, con el fin de determinar aquellas condiciones bajo las cuales se incubarían los cultivos. Los resultados demostraron que los espermatozoides provenientes de una incubación bajo carbógeno (95 %  $O_2$  - 5 %  $CO_2$ ) fueron los únicos que mantuvieron su motilidad al cabo de 24 horas o más. La incubación bajo aire, ya sea con o sin  $CO_2$  (5 %), mantuvo la motilidad de los espermatozoides sólo por períodos no mayores de 8 horas.

Finalmente los cultivos se incubaron a 33° C si bien la incubación a 37° C mostró resultados equivalentes en cuanto al mantenimiento de motilidad.

Teniendo en cuenta que nuestro objetivo final consistía en estudiar el efecto de diversos factores sobre la capacidad de reconocimiento y fertilización de los espermatozoides inmaduros, procedimos a cultivar los segmentos proximales del epidídimo (H, B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>) siguiendo básicamente la técnica recién descrita aunque con ligeras modificaciones según el caso.

El inconveniente técnico que implicaba el desenrollamiento de los túbulos epididimarios pudo resolverse para los túbulos de cabeza y cuerpo proximal, cultivando como explantos piezas enteras de estos segmentos. En estos dos casos, no se requirió la decapsulación de los túbulos.

Por el contrario, bajo ninguna de las condiciones descritas, logramos cultivar el cuerpo distal del epidídimo por más de 8 horas, ni siquiera mediante el tratamiento con hormonas o el cocultivo con diversas regiones epididimarias libres de espermatozoides. Las características de este segmento no permitieron cultivarlo como pieza entera debido al grosor del explanto resultante ni desenrollarlo en túbulos aislados debido a la extrema delgadez de los mismos.

#### Estudio histológico del túbulo epididimario en cultivo.

Con el propósito de investigar el posible efecto de la técnica de cultivo sobre la morfología del túbulo epididimario, diversos cortes de tejido provenientes de un túbulo intacto (control) o cultivado por 24 ó 72 hs., fueron analizados histológicamente al microscopio óptico.

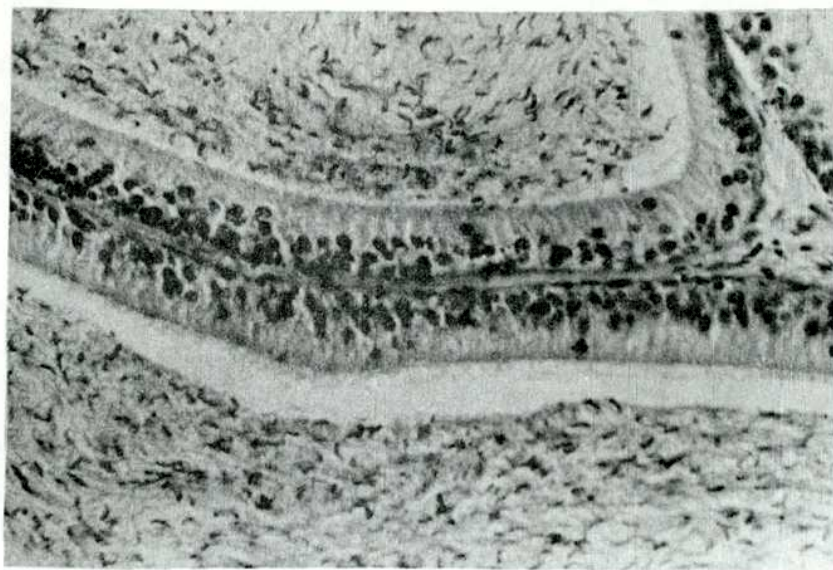
Pudimos observar entonces que el característico epitelio



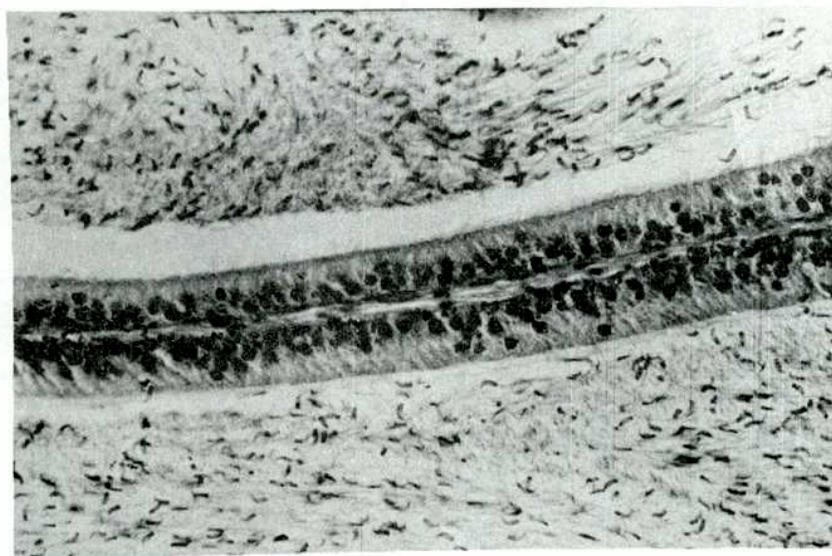
pseudoestratificado que reviste las paredes del túbulo epididimario, se mantuvo regular y parejo al cabo de un día de cultivo, (Figura 16 A y B) presentando una altura celular que no difirió significativamente de la hallada para el túbulo intacto ( $28.68 \mu\text{m} \pm 4.96$  vs  $29.20 \mu\text{m} \pm 4.35$ , respectivamente). Por su parte, las estereocilias mantuvieron su normal longitud y el lumen tubular continuó presentando una abundante cantidad de espermatozoides.

Mientras el túbulo cultivado por 24 hs., presentaba de este modo un aspecto prácticamente idéntico al del túbulo control, varios signos de involución se hicieron evidentes al cabo de 3 días de cultivo. Cabe aclarar sin embargo, que no todas las áreas se encontraban afectadas por igual, pudiéndose observar varios túbulos razonablemente preservados. En líneas generales la altura del epitelio se hallaba disminuída luego de 72 hs. de cultivo, y el lumen tubular, también reducido, contenía una menor cantidad de espermatozoides y abundantes detritos celulares. Finalmente, la proximidad de la masa de espermatozoides al borde luminal, indicó la fagocitosis de gametas por las células epiteliales.

Figura 16



A=Aspecto histológico de túbulo intactos del cuerpo proximal del epidídimo de hamster (Aumento 400 X)



B=Aspecto histológico de túbulo del cuerpo proximal del epidídimo del hamster mantenidos en cultivo durante 24 hs. (Aumento 400 X)

Efecto del tiempo de cultivo sobre la motilidad de los espermatozoides de las distintas regiones epididimarias.

Quisimos investigar cuál era el tiempo máximo durante el cual podrían cultivarse los distintos segmentos epididimarios sin que se viera afectada la motilidad de los espermatozoides contenidos.

Para ello comparamos la motilidad observada luego de 8, 24, 48 y 72 horas de cultivo, con la de aquellos espermatozoides provenientes de los mismos segmentos de un epidídimo recién extraído.

Los resultados resumidos en la Tabla VI indicaron que luego de un período de 8 horas de cultivo, los espermatozoides de todas las regiones estudiadas presentaron un grado de motilidad idéntico al del los espermatozoides control, exceptuando aquellos correspondientes al cuerpo distal, para los cuales la motilidad ya se encontraba disminuída.

Los espermatozoides de la cabeza epididimaria mantuvieron la misma motilidad que los controles durante un período de 24 horas, luego del cual la motilidad comenzó a verse disminuída.

Los espermatozoides del cuerpo proximal mostraron un grado de motilidad idéntico al de los controles al cabo de 48 horas, observándose algunas alteraciones a las 72 horas de cultivo.

Tabla VI

Efecto del tiempo de cultivo sobre espermatozoides de distintos segmentos epididimarios

Segmento	Período de cultivo (hs)				
	0	8	24	48	72
cabeza	+	+	+	+/-	
cuerpo proximal	++	++	++	++	+
cuerpo distal	+++	++	+		
cola distal	++++	++++	++++	++	++

Túbulos de diferentes segmentos epididimarios se cultivaron durante 8, 24, 48 y 72 hs.

Finalizados los diferentes períodos de cultivo, los espermatozoides se liberaron en medio BMOC a 37° C y una alícuota de cada suspensión se examinó inmediatamente al microscopio óptico.

El grado de motilidad observado en cada caso, se comparó con el correspondiente a los espermatozoides provenientes de los mismos segmentos de un epidídimo no cultivado (t=0).

El grado de motilidad se evaluó según los criterios descritos en la Tabla V.

Tal como señaláramos anteriormente, los espermatozoides de cuerpo distal sólo se mostraron mótils a las 8 horas de cultivo, presentando una motilidad francamente disminuída luego de 24 horas.

Finalmente los espermatozoides de la cola distal mantuvieron la motilidad del control por espacio de un día de cultivo, sufriendo algunas alteraciones en éste parámetro cuando provenían de túbulos cultivados durante 48 ó 72 horas.

#### Capacidad fertilizante de los espermatozoides luego de 24 horas de cultivo.

Este estudio se realizó con el objeto de investigar si la viabilidad de los espermatozoides no resultaba afectada por las condiciones de cultivo.

Por ello evaluamos la capacidad fertilizante de espermatozoides provenientes de un túbulo cultivado y la comparamos con la correspondiente a los espermatozoides del mismo segmento de un epidídimo recién extraído del animal.

Para realizar esta comparación, trabajamos con túbulos de la cola distal del epidídimo cuyos espermatozoides eran inicialmente fértiles y por lo tanto utilizables como control.

El período de cultivo seleccionado fué el de 24 horas, debido a que al cabo del mismo los espermatozoides de este segmento no presentaban modificada su motilidad (Tabla VI).

El diseño experimental consistió en inseminar en uno de los cuernos uterinos la suspensión de espermatozoides de túbulo cultivado, introduciendo la suspensión de espermatozoides controles en el cuerno contralateral.

La Tabla VII muestra los porcentajes de fertilización obtenidos para cada caso aclarando a su vez el número de ovocitos fecundados (con 2 pronúcleos y cola de espermatozoide) respecto del número total de ovocitos observados.

Los resultados encontrados indicaron que el porcentaje promedio de ovocitos fertilizados por los espermatozoides del túbulo cultivado (80 %) no fue significativamente diferente del hallado para los espermatozoides control (88 %).

En conclusión, los diversos resultados expuestos en esta sección nos permite afirmar que, bajo el conjunto de condiciones seleccionadas, es posible mantener tanto la morfología del túbulo como la motilidad y viabilidad de los espermatozoides luego de 24 horas de cultivo.

Tabla VII

Capacidad fertilizante de espermatozoides de hamster luego de 24 horas de cultivo.

Túbulos de la cola distal del epidídimo fueron cultivados durante 24 horas, luego de lo cual los espermatozoides se liberaron en medio BMOC a 37° C ( $10^7$  cel/ml). Dicha suspensión se inseminó en hembras prepúberes previamente superovuladas y 17 horas más tarde los ovocitos se recuperaron y examinaron al microscopio óptico. Los porcentajes de fertilización obtenidos se compararon con aquellos correspondientes al mismo segmento de un epidídimo intacto (no cultivado).

Nº Experimento	túbulo control	túbulo cultivado
1	5/6 <sup>a</sup> (83) <sup>b</sup>	3/6 (50)
2	4/10 (40)	15/28 (54)
3	10/10 (100)	18/18 (100)
4	13/14 (93)	17/25 (68)
5	24/24 (100)	10/10 (100)
6	12/12 (100)	7/10 (70)
7	18/21 (86)	13/15 (87)
8	17/19 (90)	10/11 (91)
9	15/15 (100)	11/11 (100)
$\bar{X} \pm ES$	88.0 $\pm$ 6.4	80.0 $\pm$ 6.6 *

a= Nº de ovocitos fertilizados / Nº de ovocitos observados

b= porcentaje de fertilización

$\bar{X}$ = porcentaje promedio de fertilización

\*= NS respecto del control



### Estimulación androgénica de los túbulos epididimarios en cultivo.

Como señaláramos anteriormente, los andrógenos inter - vendrían en el proceso de maduración de los espermatozoides, a través de su acción sobre el tejido epididimario.

El mecanismo propuesto para explicar dicho efecto hormonal involucraría la estimulación de la síntesis de diversos productos secretorios, los cuales una vez liberados del lumen, favorecerían la maduración de los espermatozoides, ya sea modificando el entorno que los rodea o bien interactuando directamente con los mismos.

Con el fin de corroborar esta secuencia de eventos y te - niendo en cuenta que los túbulos epididimarios en cultivo han mostrado ser estimulables por hormonas en diversas especies (67), (295) (296), decidimos utilizar el sistema de cultivo previamente descripto para estudiar el efecto de los andrógenos sobre el tejido epididimario, sobre su capacidad de síntesis proteica y finalmente sobre el grado de maduración de los espermatozoides contenidos.

### Efecto de los andrógenos sobre la morfología del túbulo epididimario.

Los túbulos epididimarios de cuerpo proximal cultivados durante 24 hs. en presencia de 5  $\alpha$  DHT (1  $\mu$  M y 2  $\mu$  M) mostraron

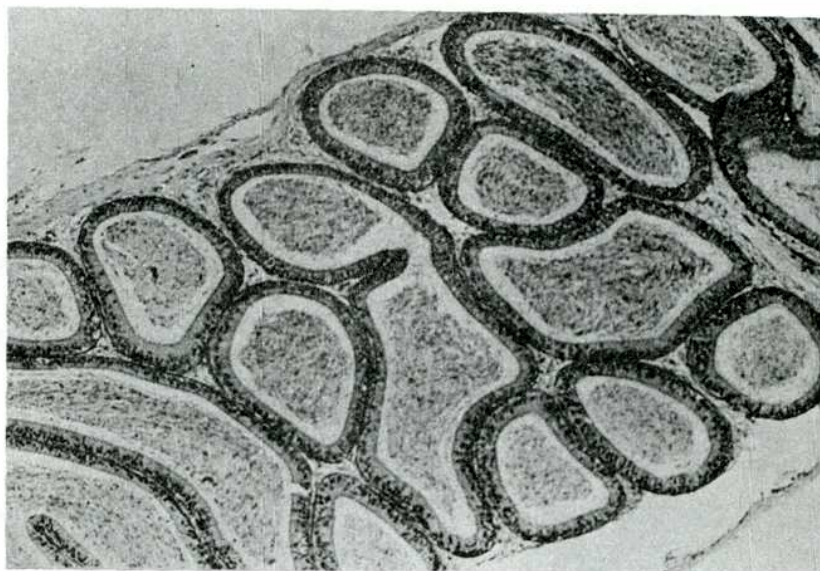
al microscopio óptico, claros signos de hipertrofia celular (Figura 17 A y B). El agregado de concentraciones menores de  $5 \alpha$  DHT ( $0.1 \mu M$  y  $0.5 \mu M$ ), no produjo modificaciones apreciables. Cabe aclarar sin embargo, que en ninguno de los casos analizados se observó un efecto de los andrógenos sobre el tejido conectivo o muscular circundante, limitándose dicho estímulo al epitelio que tapiza la luz tubular.

Tal como puede observarse en la Tabla VIII, el agregado de andrógenos al medio de cultivo produjo un aumento significativo de la altura del epitelio secretor, respecto de la observada para el túbulo cultivado en ausencia de  $5 \alpha$  DHT. El diámetro del lumen tubular por su parte, presentó un valor mayor que el correspondiente al túbulo control, aunque la diferencia no resultó ser significativa.

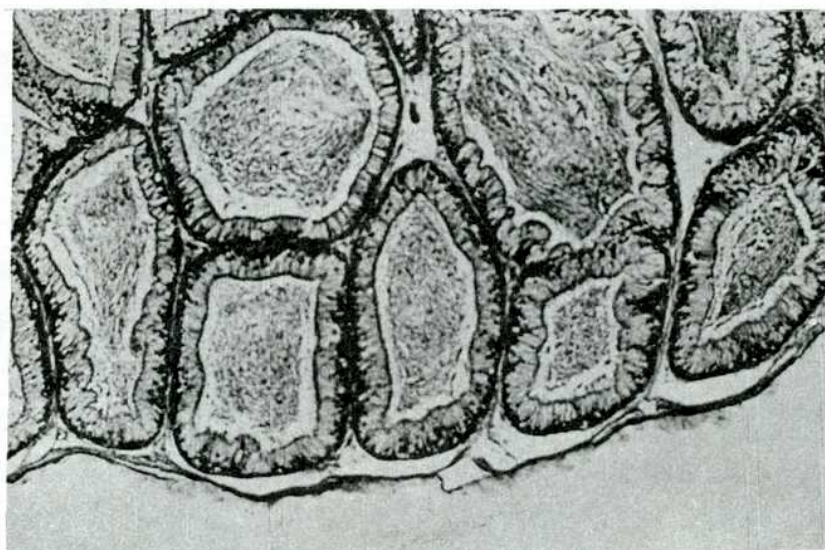
El citoplasma celular expandido hacia la luz y los núcleos desplazados hacia la base, constituyeron otro de los índices de la estimulación hormonal (Figura 17 C y D). En algunas regiones pudimos observar incluso pronunciadas proyecciones del epitelio hacia el lumen tubular, el cual a su vez, presentaba una abundante cantidad de espermatozoides y escasos detritos celulares.

La presencia de andrógenos en el medio de cultivo durante tiempos mayores (72 hs.), no produjo cambios significativamente di-

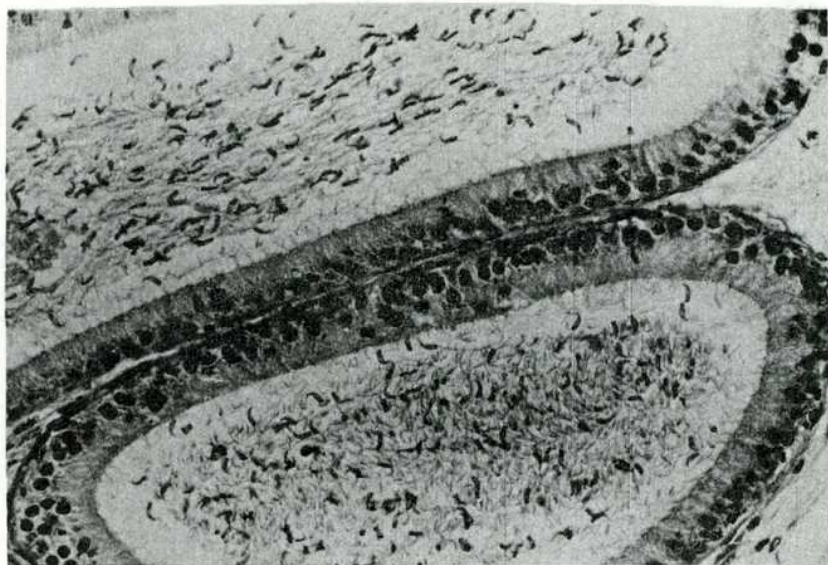
Figura 17



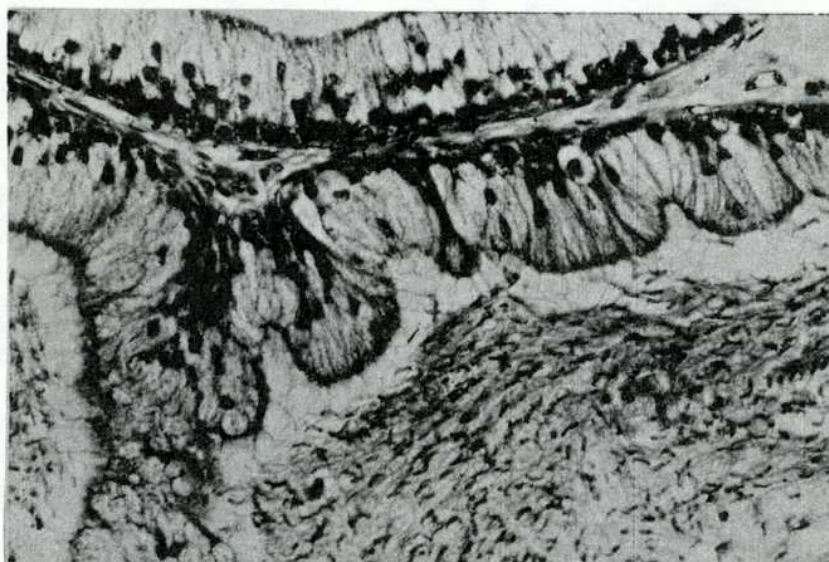
A= Aspecto histológico de túbulos del cuerpo proximal del epidídimo de hamster mantenidos en cultivo durante 24 hs. (Aumento 100 X)



B= Aspecto histológico de túbulos del cuerpo proximal del epidídimo de hamster mantenidos en cultivo durante 24 hs, en un medio con teniendo 5α -DHT 2 μM (Aumento 100 X).



C= Aspecto histológico de túbulos del cuerpo proximal del epidídimo de hamster mantenidos en cultivo durante 24 hs. (Aumento 400 X).



D= Aspecto histológico de túbulos del cuerpo proximal del epidídimo de hamster mantenidos en cultivo durante 24 hs. en un medio con teniendo 5  $\alpha$  DHT 2  $\mu$ M (Aumento 400 X).

Tabla VIII

Efecto del agregado de  $5\alpha$  -DHT al medio de cultivo sobre la altura del epitelio y el diámetro del lumen tubular.

Tratamiento	n	altura celular ( $\mu\text{m} \pm \text{ES}$ )	n	Diámetro del lumen tubular ( $\mu\text{m} \pm \text{ES}$ )
túbulo cultivado sin andrógeno (control)	40	$28.68 \pm 4.96$	19	$300.52 \pm 51.04$
túbulo cultivado con $5\alpha$ -DHT ( $2\mu\text{M}$ )	40	$44.75 \pm 11.43^*$	30	$324.16 \pm 84.88^{**}$

\*  $p < 0.001$  vs. control

\*\* NS vs. control

El análisis morfométrico se realizó sobre cortes de tejido fijados y teñidos, provenientes de túbulos del cuerpo proximal del epidídimo cultivados durante 24 horas en presencia o ausencia de  $5\alpha$  -DHT ( $2\mu\text{M}$ ).

ferentes de aquellos observados luego de 24 horas de estimulación.

Efecto de los andrógenos sobre la síntesis de proteínas en cultivo.

El siguiente paso de nuestro estudio consistió en determinar si la estimulación androgénica de los túbulos cultivados era capaz de producir una respuesta similar a la obtenida anteriormente in vivo, en lo que respecta a la síntesis de las glicoproteínas PE<sub>1-6</sub>.

Para ello, túbulos provenientes de cabeza, cuerpo proximal y cola distal del epidídimo, se cultivaron primeramente durante 27 horas en un medio libre de aminoácidos y hormonas y luego durante 17 horas en un medio conteniendo una mezcla de aminoácidos tritiados y al que se había agregado (tratado) o no (control) 5  $\alpha$  DHT en una concentración 2  $\mu$  M.

Finalizado el período de cultivo, se procedió a analizar mediante geles de poliacrilamida la radioactividad incorporada a las proteínas sintetizadas por el tejido.

Los resultados obtenidos indicaron que si bien los andrógenos fueron capaces de estimular la síntesis proteica en los tres segmentos estudiados, la mayor incorporación de radioactividad correspondía a las regiones de la cabeza y cuerpo proximal.

En la Figura 18A, se esquematiza el perfil de la incorpora-

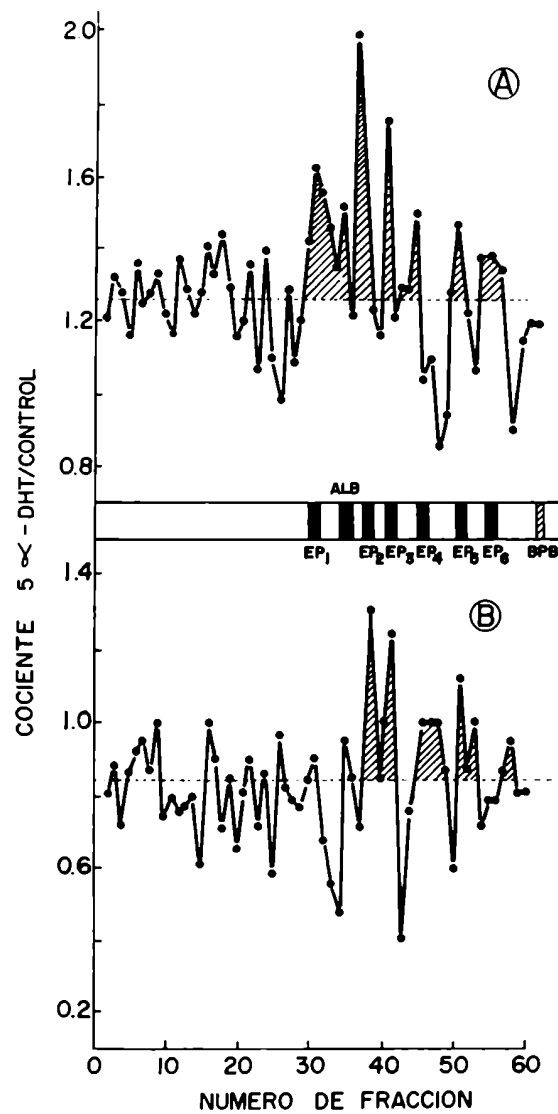


Figura 18: Efecto de los andrógenos sobre la síntesis de proteínas epididimarias y su interacción con los espermatozoides. Túbulos epididimarios del cuerpo proximal (50-100 mg)

fueron cultivados durante 27 hs. en BMOC y durante 17 hs. adicionales en BMOC conteniendo 1 mM de Metionina y 10  $\mu$  ci de aminoácidos  $^3\text{H}$ . La mitad de las cápsulas recibieron también DHT 2  $\mu$  M. Finalizada la incubación se procedió a la preparación del citosol del tejido cultivado y a la extracción con NaCl 0.5 M de las proteínas asociadas a la superficie de los espermatozoides provenientes de dichos túbulos.

Ambas muestras se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10 %, los cuales posteriormente fueron cortados y contados. Cada muestra estimulada (tejido o extracto proteico de espermatozoides) se comparó con su control (no estimulado), calculándose el cociente cpm de muestras estimuladas / cpm muestras control.

Panel A: perfil obtenido en el citosol epididimario.

Panel B: perfil obtenido en el extracto proteico de espermatozoides, El esquema del gel ubicado entre ambos paneles, muestra la posición de las bandas PE<sub>1-6</sub>. Alb= Albúmina BPB= azul de bromofenol.



ción hallado para el cuerpo proximal al graficar el cociente  $\text{cpm } ^3\text{H}$  túbulo tratado/ $\text{cpm } ^3\text{H}$  túbulo control, para cada fracción.

El análisis del mismo indica la presencia de 6 picos de reinducción cuyos  $R_a$  coincidieron con aquellos correspondientes a las proteínas  $\text{PE}_{1-6}$  estimuladas in vivo por la administración de andrógenos.

Con el objeto de investigar si estas proteínas sintetizadas por el cuerpo proximal eran secretadas a la luz tubular, interactuando posteriormente con los espermatozoides, decidimos extraer las proteínas asociadas a la superficie de los espermatozoides contenidos, analizando luego la radioactividad incorporada a las mismas.

En la Figura 18 B se muestra el perfil obtenido al graficar el cociente:  $\text{cpm } ^3\text{H}$  de espermatozoides del túbulo tratado/ $\text{cpm } ^3\text{H}$  de espermatozoides del túbulo control, para cada fracción.

Es importante observar que las movilidades electroforéticas de las proteínas inducidas extraídas de los espermatozoides coincidieron con las halladas para el tejido cultivado, siendo los dos picos principales aquellos cuyos  $R_a$  se correspondían con los de las bandas  $\text{PE}_2$  y  $\text{PE}_3$  detectadas mediante la estimulación in vivo.

En conclusión, los resultados que acabamos de presentar apoyarían el mecanismo de acción hormonal antes propuesto, ya que

los túbulos epididimarios del cuerpo proximal respondieron a la estimulación androgénica a través de la síntesis y secreción de diversas proteínas que posteriormente se detectaron asociadas a la superficie de los espermatozoides ( $PE_{2-5}$ ).

Efecto del andrógeno sobre la capacidad de unión de los espermatozoides.

Los estudios que describiremos a continuación se realizaron con el objeto de investigar si aquellos espermatozoides provenientes de los túbulos cultivados en presencia del andrógeno, presentaban algún cambio en su grado de maduración que fuera concomitante a la interacción de los mismos con las proteínas epididimarias sintetizadas y secretadas al lumen.

Para ello evaluamos la capacidad de reconocimiento de espermatozoides recuperados de túbulos del cuerpo proximal, cultivados durante 24 horas en presencia (estimulado) o ausencia (control) de DHT  $2\mu M$ .

Dado que la hormona que debía agregarse al medio de cultivo se encontraba disuelta en etanol, investigamos primeramente el efecto del mismo sobre la viabilidad de los espermatozoides. Los resultados observados en este estudio indicaron que el agregado del ve

hículo, en las cantidades requeridas por el ensayo, no alteraba en modo alguno ni la motilidad ni la capacidad de unión de dichos espermatozoides. En base a estas observaciones, pasamos a estudiar el efecto de la DHT sobre la capacidad de reconocimiento de los espermatozoides, hallando los resultados que se resumen en la Tabla IX.

Como puede observarse hubo un notable aumento en la capacidad de unión de aquellos espermatozoides provenientes de los túbulos estimulados, obteniéndose una disminución significativa en el porcentaje de ovocitos que no presentan ningún espermatozoide unido y un incremento simultáneo y significativo del porcentaje de ovocitos con 1-5 y con más de 10 espermatozoides unidos.

Si bien también se produjo un aumento en el porcentaje de ovocitos que presentaban entre 5 y 10 espermatozoides unidos, los valores correspondientes a este grupo no resultaron ser significativamente diferentes entre sí de acuerdo al análisis estadístico empleado.

En la misma tabla se presentan los datos expresados como el número promedio de espermatozoides unidos por ovocito para cada caso. El valor obtenido para el túbulo estimulado fue significativamente mayor que el encontrado para el túbulo control, lo cual estaría reflejando nuevamente la acción estimuladora de los andrógenos

Tabla IX

Efecto del agregado de  $5\alpha$ -DHT al medio de cultivo sobre la capacidad de los espermatozoides de unirse a la zona pelúcida.

Tratamiento	Nº total de ovocitos	Nº (%) de ovocitos con				Nº Promedio de esp/ovocito $\pm$ ES
		0	1-5	5-10	>10	
Control	78	56 (72)	18 (23)	4 (5)	0 (0)	0.78 $\pm$ 0.41
$5\alpha$ DHT	99	** 21 (21)	** 52 (53)		* 15 (15)	** 5.51 $\pm$ 1.85

N= 12

\*  $p < 0.01$  vs. control

\*\*  $p < 0.001$  vs. control

Ambos túbulos del cuerpo proximal de un mismo animal fueron cultivados durante 24 hs. en presencia o ausencia de  $5\alpha$ -DHT ( $2\mu$  M).

Finalizado el cultivo los espermatozoides se liberaron en medio BMOC a  $37^{\circ}$  C ( $10^7$  cel/ml) determinándose luego la capacidad de unión a zona pelúcida de cada población.

sobre la capacidad de reconocimiento de los espermatozoides de unirse a la zona pelúcida.

Especificidad del efecto del andrógeno sobre la capacidad de unión de los espermatozoides.

Para determinar la especificidad del efecto producido por la DHT, decidimos evaluar la capacidad de unión de aquellos espermatozoides provenientes de túbulos cultivados durante 24 horas en presencia de otros andrógenos. Observamos entonces que tanto el  $3\alpha$  como  $3\beta$  androstandiol, agregados al medio de cultivo en una concentración  $2\mu M$ , fueron incapaces de incrementar la capacidad de reconocimiento de los espermatozoides.

Por su parte, el agregado simultáneo al medio de cultivo de DHT ( $2\mu M$ ) y el antiandrógeno acetato de ciproterona ( $4\mu M$ ), logró reducir significativamente el efecto estimulador producido por el andrógeno.

Los resultados hallados para este último estudio se presentan en la Tabla X y muestran el aumento significativo del porcentaje de ovocitos que no presentan ningún espermatozoide unido, como así también la disminución significativa del porcentaje de ovocitos con más de 10 espermatozoides unidos.

Tabla X

Efecto del agregado de 5  $\alpha$  DHT y Acetato de ciproterona al medio de cultivo, sobre la capacidad de los espermatozoides de unirse a la zona pelúcida.

Tratamiento	Nº total de ovocitos	Nº (%) de ovocitos con				Nº Promedio de esp/ovocito $\pm$ ES
		0	1-5	5-10	>10	
5 $\alpha$ DHT (Control)	111	42 (38)	55 (50)	6 (5)	8 (7)	2.61 $\pm$ 0.80
5 $\alpha$ DHT + Acetato de ciproterona	111	** 69 (62)	41 (37)	1 (1)	* 0 (0)	* 0.79 $\pm$ 0.20

N= 19

\*=  $p < 0.02$  vs. control

\*\*=  $p < 0.01$  vs. control

Túbulos del cuerpo proximal correspondiente al epidídimo izquierdo y derecho de cada animal se cultivaron durante 24 horas en presencia de 5  $\alpha$  -DHT ( $2 \mu M$ ) y 5  $\alpha$  -DHT ( $2 \mu M$ ) más acetato de ciproterona ( $4 \mu M$ ) respectivamente).

Finalizado el cultivo los espermatozoides se liberaron en medio BMOC a 37° C, evaluándose su capacidad de unión a la zona pelúcida.

Los porcentajes de ovocitos que presentaban entre 1-5 y 5-10 espermatozoides unidos también disminuyeron (37% vs 50% y 1% vs 5% respectivamente) aunque dicha diferencia no resultó ser significativa cuando se llevó a cabo el análisis estadístico de los datos.

Efecto de la cicloheximida sobre la capacidad de unión de los espermatozoides.

Los estudios que hemos descripto hasta el momento indican que tanto la síntesis y secreción de proteínas epididimarias, como la capacidad de los espermatozoides de unirse a la zona pelúcida, aumentan significativamente en respuesta a la estimulación androgénica.

Sin embargo, la concomitancia de estos dos eventos no nos permiten asegurar que las proteínas sintetizadas estén participando como mediadores de la acción de los andrógenos en el proceso de maduración.

Con el propósito de hallar nuevas evidencias que apoyen dicha teoría, evaluamos la capacidad de unión de los espermatozoides provenientes de un túbulo cultivado durante 24 horas en un medio al que se había agregado simultáneamente 5  $\alpha$  DHT ( $2 \mu M$ ) y un inhibidor de la síntesis proteica como lo es la cicloheximida ( $20 \mu M$ ).

Los controles correspondientes a este experimento consistieron en túbulos cultivados durante 24 horas en un medio conteniendo

Tabla XI

Efecto del agregado de cicloheximida al medio de cultivo, sobre la capacidad de los espermatozoides de unirse a la zona pelúcida.

Tratamiento	Nº total de ovocitos	Nº (%) de ovocitos con				Nº Promedio de esp/ovocito ± ES
		0	1-5	5-10	>10	
5 α DHT ( control)	86	35(41)	24(28)	17(20)	10(11)	4.29 ± 1.43
5 α + DHT cicloheximida	97	* 64(66)	30(31)	* 3(3)	* 0(0)	** 0.72 ± 0.35

N= 8

\* = p < 0.01 vs. control

\*\* = p < 0.05 vs. control

Túbulos del cuerpo proximal correspondientes al epidídimo izquierdo y derecho de cada animal, fueron cultivados durante 24 horas en presencia de 5 α -DHT (2 μm) y 5 α -DHT más cicloheximida (20 μM) respectivamente. Finalizado el cultivo se evaluó la capacidad de unión a zona pelúcida de los espermatozoides de cada población.



sólo DHT ( $2\mu M$ ). Como puede observarse en la Tabla XI, la presencia del inhibidor produjo un aumento significativo en el porcentaje de ovocitos que no presentaban ningún espermatozoide unido (66 % vs 41 %) y una disminución también significativa del porcentaje de ovocitos con 5 a 10 y con más de 10 espermatozoides unidos (3 % vs 20 % y 0 % vs 11 % respectivamente).

Estos resultados también se ven reflejados en la disminución significativa del número promedio de espermatozoides unidos por ovocito ( $0.72 \pm 0.35$  vs  $4.29 \pm 1.43$ ).

#### Efecto de las proteínas epididimarias sobre la capacidad de unión de los espermatozoides.

La supresión del efecto estimulador de la 5 $\alpha$  DHT producido por la cicloheximida, constituye una nueva evidencia en favor de la participación de proteínas andrógeno-dependientes en el proceso de maduración.

Con el objeto de confirmar en forma más definitiva este último concepto, nuestro próximo paso consistió en evaluar la capacidad de reconocimiento de espermatozoides provenientes de túbulos del cuerpo proximal, cultivados durante 24 horas en presencia de un extracto enriquecido en las glicoproteínas EP<sub>1-6</sub>.

En una primer serie de 17 experimentos, la capacidad de unión de estos espermatozoides se comparó con la de aquellos recuperados de túbulos del segmento contralateral, cultivados durante 24 hs. en medio 199 (Earle). Los resultados presentados en la Tabla XII muestran que el agregado de proteínas al medio de cultivo produjo una disminución significativa del número de ovocitos que no presentaban ningún espermatozoide unido a la zona pelúcida (57 % vs 77 %) y un aumento simultáneo en el porcentaje de ovocitos con más de 10 espermatozoides unidos (8 % vs 0 %).

Los porcentajes de ovocitos con 1-5 y 5-10 espermatozoides también fueron mayores que aquellos encontrados para el control, aunque no en forma significativa.

Este incremento en la capacidad de unión de los espermatozoides, obtenido por efecto del extracto epididimario enriquecido, también se ve reflejado en el número promedio de espermatozoides unidos por ovocito, el cual fue significativamente mayor para el túbulo tratado ( $2.73 \pm 1.42$ ) que para el túbulo control ( $0.55 \pm 0.19$ ).

Tal como se deduce a partir de estos resultados, el agregado del extracto enriquecido en PE<sub>1-6</sub> al medio de cultivo, es capaz de reproducir el efecto obtenido mediante la estimulación androgénica de los túbulos epididimarios.

Tabla XII

Efecto del extracto epididimario enriquecido en PE<sub>1-6</sub>, sobre la capacidad de los espermatozoides de unirse a la zona pelúcida.

Tratamiento	Nº total de ovocitos	Nº (%) de ovocitos con				Nº Promedio de esp/ovocito ± ES
		0	1-5	5-10	>10	
Control	124	95 (77)	28 (22)	1 (1)	0 (0)	0.55 ± 0.19
Extracto epididimario	132	* 76 (57)	42 (32)	4 (3)	* 10 (8)	** 2.73 ± 1.42

N= 17

\* =  $p < 0.01$  vs control

\*\* =  $p < 0.02$  vs control

Túbulos del cuerpo proximal correspondientes al epidídimo izquierdo y derecho de cada animal, fueron cultivados durante 24 horas en presencia o ausencia (control) de 1 mg/ml del extracto enriquecido en las glicoproteínas epididimarias PE<sub>1-6</sub> y libre de andrógenos.

Finalizado el período de cultivo, se evaluó la capacidad de unión a zona pelúcida de cada población de espermatozoides.

Para descartar la posibilidad de que los andrógenos endógenos del epidídimo fueran los verdaderos responsables del efecto observado, distintas muestras del extracto epididimario fueron sometidas a un análisis de radioinmunoensayo para andrógenos activos (T y 5 $\alpha$  DHT).

Los resultados obtenidos en este caso, indicaron que la concentración de andrógenos presentes en el extracto estaba por debajo del límite de detección de la técnica empleada (120 pg/ml), siendo aproximadamente 4 órdenes de magnitud menor que la concentración de 5 $\alpha$  DHT requerida para aumentar la capacidad de unión de los espermatozoides,

Finalmente, en un grupo de 10 experimentos, investigamos la especificidad del efecto producido por la preparación enriquecida en las glicoproteínas.

Para ello comparamos la capacidad de unión de espermatozoides provenientes de túbulos expuestos durante 24 hs. a la fracción enriquecida, con aquella obtenida al cultivar los túbulos epididimarios en presencia de la misma fracción, pero esta vez obtenida a partir de un citosol de epidídimo de animales castrados por 30 días.

Los resultados presentados en la Tabla XIII indicaron un aumento significativo en el porcentaje de ovocitos que no presentaban ningún espermatozoide unido (83 % vs 47 % control) y una disminución

Tabla XIII

Efecto de los extractos epididimarios enriquecidos en PE<sub>1-6</sub> y provenientes de animales normales o castrados, sobre la capacidad de los espermatozoides de unirse a la zona pelúcida.

Tratamiento	Nº Total de ovocitos	Nº (%) de ovocitos con				Nº Promedio esp/ovocito ± ES
		0	1-5	5-10	>10	
Extracto epididimario (normal)	57	27(47)	22(39)	2(3)	6(11)	2.67 ± 1.49
Extracto epididimario (castrado)	53	* 44(83)	** 5(9)	2(4)	2(4)	*** 1.04 ± 0.68

N= 10

\* p < 0.001

\*\* p < 0.01

\*\*\* p < 0.05

Túbulos del cuerpo proximal correspondientes al epidídimo izquierdo y derecho de cada animal, fueron cultivados durante 24 horas en presencia de 1 mg/ml de los extractos epididimarios enriquecidos en las glicoproteínas PE<sub>1-6</sub> y provenientes de animales normales o castrados por 30 días.

Finalizado el período de cultivo se evaluó la capacidad de unión a zona pelúcida de cada población de espermatozoides.

significativa en el porcentaje de ovocitos con 1 a 5 espermatozoides unidos (9 % vs 39 % control). Si bien también observamos una disminución en el porcentaje de ovocitos con más de 10 espermatozoides unidos, los valores no resultaron ser significativamente diferentes entre sí (4 % vs 11 % control). La menor capacidad de unión de los espermatozoides a la zona pelúcida también se vio reflejada en la disminución significativa del número promedio de espermatozoides unidos a cada ovocito. (1.04 ± 0.68 vs 2.67 ± 1.49)

Efecto del agregado de andrógenos y proteínas sobre la capacidad fertilizante de los espermatozoides.

El análisis conjunto de los resultados presentados hasta el momento indica la existencia de un aumento en la capacidad de reconocimiento de los espermatozoides inmaduros del cuerpo proximal, producido por la estimulación androgénica de los túbulos epididimarios y mediado por las glicoproteínas secretorias PE<sub>1-6</sub>.

El último paso dentro de esta serie de experimentos destinados a investigar el rol biológico de las proteínas PE<sub>1-6</sub> en el proceso de maduración, consistió en estudiar el efecto ya sea de los andrógenos como del extracto enriquecido, sobre otro de los parámetros indicativos del grado de maduración de un espermatozoide, como lo es su capacidad de penetrar al ovocito.

Si bien el perfil epididimario de fertilidad obtenido anteriormente identificaba al cuerpo distal del epidídimo como la región más adecuada para estudiar los potenciales cambios de capacidad fertilizante, estos experimentos se llevaron a cabo utilizando nuevamente el cuerpo proximal, debido a la imposibilidad de mantener la motilidad y viabilidad de los espermatozoides del cuerpo distal luego de 24 hs. de cultivo. En la Tabla XIV se presentan los porcentajes de fertilidad obtenidos luego de la inseminación in vivo de espermatozoides provenientes de túbulos de B<sub>1</sub>, cultivados durante 24 hs. en presencia (tratado) o ausencia (control) de andrógenos (DHT 2  $\mu$  M y 3 $\alpha$  diol 2  $\mu$  M), o bien de cantidades crecientes (0.2 a 8 mg/ml) del extracto epididimario enriquecido en PE<sub>1-6</sub>. Como puede observarse, tanto los andrógenos como las diversas concentraciones del extracto enriquecido, fueron incapaces de incrementar la capacidad fertilizante de los espermatozoides, obteniéndose consistentemente un 0 % de fertilización en todos los casos.

Tabla XIV

Efecto de los andrógenos y del extracto epididimario enriquecido en PE<sub>1-6</sub> sobre la capacidad fertilizante de los espermatozoides.

Túbulos del cuerpo proximal correspondientes a uno de los epidídimos de cada animal, fueron cultivados durante 24 hs. en presencia de diversas cantidades del extracto proteico (0.2 mg a 8 mg/ml), o bien de 5 $\alpha$  DHT y 3 $\alpha$ -diol (2 $\mu$  M). Los controles de cada caso, corresponden a los epidídimos contralaterales cultivados durante 24 hs. sin agregado alguno al medio de cultivo.

Finalizado el período de cultivo los espermatozoides se liberaron en BMOC a 37 $^{\circ}$  C (10<sup>7</sup> cel/ml) y alícuotas de dichas suspensiones se inseminaron in vivo en hembras prepúberes previamente superovuladas. Los ovocitos se recuperaron 17 hs. más tarde y se examinaron al microscopio para evaluar los porcentajes de fertilización resultantes.



Tratamiento	control	tratado
extracto epididimario (0.2 mg/ml)	0/40 <sup>a</sup> (0) <sup>b</sup>	0/36 (0)
extracto epididimario (2.5 mg/ml)	0/34 (0)	0/48 (0)
extracto epididimario (5 mg/ml)	0/35 (0)	0/52 (0)
extracto epididimario (8 mg/ml)	0/39 (0)	0/30 (0)
5 $\alpha$ -DHT (2 $\mu$ M)	0/42 (0)	0/62 (0)
3 $\alpha$ -diol (2 $\mu$ M)	0/61 (0)	0/51 (0)

a= N<sup>o</sup> de ovocitos fertilizados/N<sup>o</sup> de ovocitos observados

b= porcentaje de fertilización

Resultados obtenidos utilizando a la rata como animal de experimentación.

Tal como hemos aclarado oportunamente, tanto nuestra experiencia propia como la de otros grupos de investigación, indicaban que la rata no era la especie más adecuada para desarrollar las diversas técnicas y ensayos biológicos que requieren los estudios de fertilidad.

Sin embargo, el hecho de haber hallado las condiciones experimentales necesarias para evaluar la capacidad de reconocimiento y la capacidad fertilizante de los espermatozoides de hamster, nos permitió llevar a cabo en la rata nuestros primeros estudios sobre el papel biológico de las proteínas DE en el proceso de fertilización.

Es importante destacar que en esta especie contábamos no sólo con numerosos resultados acerca de la interacción entre DE y los espermatozoides epididimarios, sino con la disponibilidad de las proteínas y sus anticuerpos correspondientes ya purificados.

Desarrollo de los ensayos biológicos.

El ensayo de unión de espermatozoides a la zona pelúcida de los ovocitos de rata se realizó siguiendo el mismo esquema apli-

cado anteriormente en el hamster.

Para ello espermatozoides provenientes de la cola distal del epidídimo se pusieron en contacto durante 40 minutos, con ovocitos previamente sometidos a los diversos tratamientos ya descritos.

Finalizado el período de interacción, observamos que ninguno de los ovocitos recuperados presentaba espermatozoides unidos en forma específica a su zona pelúcida.

La capacitación previa de los espermatozoides durante 4 horas no modificó los resultados obtenidos, como así tampoco lo hizo el empleo de ovocitos heterólogos de hamster.

Pasamos entonces a investigar las condiciones más apropiadas para evaluar la capacidad fertilizante de los espermatozoides, para lo cual espermatozoides de la cola distal del epidídimo ( $10^7$  esperm/ml) se inseminaron en los cuernos uterinos de hembras prepúberes previamente superovuladas, procediéndose a examinar los ovocitos 17, 24 y 48 hs. más tarde.

En la Tabla XV se resumen los distintos estadíos y porcentajes de penetración y/o fertilización encontrados para cada horario.

La comparación de estos resultados con aquellos obtenidos anteriormente en el hamster, indican la existencia de un desfase en lo que respecta a los estadíos de fertilización observados en cada caso.

Tabla XV

Estadíos de fertilización correspondientes a ovocitos de rata observados a diferentes tiempos luego de la inseminación.

Tiempos de observación luego de <u>in</u> seminación	Estadío observado	% de penetración y/o fertilización
12	ovocitos no penetrados	100
17	ovocitos con espermatozoide/s en espacio perivitelino	100
24	ovocitos con espermatozoide/s en espacio perivitelino ovocitos con 2 pronúcleos y cola de espermatozoide/s en citoplasma celular	60 40
48	ovocitos en estadio de 2 células	100

Espermatozoides de la cola distal del epidídimo se inseminaron in vivo en hembras prepúberes previamente superovuladas. Los ovocitos se recuperaron al cabo de los períodos señalados y se examinaron al microscopio óptico. Los porcentajes de penetración y/o fertilización están referidos al total de ovocitos fecundados.

### Perfil de fertilidad.

Para realizar este estudio comenzamos evaluando la capacidad fertilizante de espermatozoides provenientes de 5 segmentos previamente seleccionados: cabeza (H), cuerpo proximal ( $B_1$ ), cuerpo distal ( $B_2$ ), cola proximal ( $T_1$ ) y cola distal ( $T_2$ ).

El esquema experimental consistió en la inseminación in vivo de espermatozoides de H,  $B_1$ ,  $B_2$  y  $T_1$  en uno de los cuernos uterinos, utilizando como control espermatozoides de  $T_2$  inseminados en el cuerno contralateral. Los porcentajes de fertilidad obtenidos para cada segmento epididimario se presentan en la Tabla XVI e indican un aumento de la capacidad fertilizante en sentido céfalo caudal.

Los espermatozoides de cabeza y cuerpo proximal se mostraron totalmente incapaces de fertilizar a un ovocito, tal como lo indican el 0 % de fertilización obtenido para ambos casos.

Los porcentajes de fertilización correspondientes al cuerpo distal ( $B_2$ ) fueron totalmente nulos en algunos casos, o bien tan elevados como el correspondiente a la cola proximal, cuyo valor (40%) no difirió significativamente de aquel obtenido para la cola distal del órgano (55 %).

Tabla XVI

Capacidad fertilizante de espermatozoides provenientes de distintos segmentos del epidídimo de rata

Segmento	n	número de ovocitos observados	% promedio de fertilización $\pm$ ES
cabeza	5	55	0
cuerpo proximal	11	110	0
cuerpo distal	7	71	ND *
cola proximal	4	73	40.1 $\pm$ 15.4
cola distal	29	306	54.9 $\pm$ 5.9

\* ND= No fue posible determinar un porcentaje de fertilización promedio pues los valores correspondientes a este segmento fueron extremadamente diferentes.

Alícuotas de una suspensión de espermatozoides provenientes de H, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y T<sub>1</sub> se inseminaron en uno de los cuernos uterinos de hembras pre-púberes superovuladas, colocándose en el cuerno contralateral una suspensión de espermatozoides de T<sub>2</sub> utilizada como control. En todos los casos los ovocitos se recuperaron y examinaron al microscopio óptico 48 hs. luego de la inseminación.

Mientras el 100 % de los ovocitos de hamster presentan dos pronúcleos y cola de espermatozoide a las 17 horas luego de la inseminación, el 100 % de los ovocitos de rata presentan uno o más espermatozoides en el espacio perivitelino.

Cabe aclarar que la presencia de más de un espermatozoide por ovocito, ya sea en el espacio perivitelino o en el citoplasma celular, se conoce con el nombre de poliespermia y es un fenómeno típico del ovocito fecundado de rata.

Si bien ya a las 24 horas, el 100 % de los ovocitos de hamster se encuentran divididos, recién el 40 % de los ovocitos de rata, presentan 2 pronúcleos en el citoplasma celular. Debido a la dificultad que implica la visualización del espermatozoide en este último estadio, seleccionamos el horario de 48 como el más adecuado para realizar nuestros estudios posteriores.

En este último horario, el 100 % de los ovocitos se encuentran en el estadio de 2 células y el espermatozoide se distingue claramente atravesando ambas blastómeros.

Los ovocitos de rata que no han sido fertilizados tienen tendencia a activarse y dividirse rápidamente, aunque a diferencia de lo que ocurre en el hamster, su aspecto es francamente diferente al del ovocito fecundado.

Mantenimiento de túbulos epididimarios de rata en cultivo de órgano.

Con el objeto de dilucidar el rol biológico de las proteínas DE en el proceso de maduración, comenzamos estudiando la posibilidad de cultivar los túbulos epididimarios de rata, bajo las mismas condiciones seleccionadas previamente para el cultivo de epidídimo de hamster.

Los resultados obtenidos indicaron que luego de 24 a 72 hs. de cultivo, no se ven afectados ni la morfología del tejido ni la motilidad de los espermatozoides provenientes de la cabeza, cuerpo proximal y cola distal del epidídimo. Por el contrario, la motilidad de los espermatozoides del cuerpo distal disminuye significativamente al cabo de sólo 8 hs. de cultivo.

Finalmente, para determinar el efecto del cultivo sobre la viabilidad de las gametas, comparamos la capacidad fertilizante de espermatozoides ya maduros provenientes de túbulos de la cola distal cultivados durante 24 hs., con aquella correspondiente a los espermatozoides del mismo segmento de un epidídimo intacto.

Tal como puede observarse en la Tabla XVII el porcentaje promedio de fertilidad obtenido para el túbulo cultivado (49.3 %), no difirió significativamente de aquel encontrado para el túbulo control (56.6 %), lo cual sumado a los resultados anteriores, nos permite



Tabla XVII

Efecto del cultivo sobre la capacidad fertilizante de espermatozoides de rata.

No Exp.	túbulo control	túbulo cultivado
1	12/16 <sup>a</sup> (75) <sup>b</sup>	6/10 (60)
2	6/17 (35)	5/11 (45)
3	13/13 (100)	11/12 (92)
4	11/17 (65)	5/7 (71)
5	5/13 (39)	2/10 (20)
6	2/9 (22)	2/5 (40)
7	10/27 (37)	3/19 (16)
8	8/10 (80)	3/6 (50)
$\bar{X} \pm ES$	56.6 $\pm$ 9.6	* 49.3 $\pm$ 8.9

\* NS respecto del control.

a= No de ovocitos fertilizados/No de ovocitos observados

b= porcentaje de fertilización

Túbulos de la cola distal del epidídimo fueron cultivados durante 24 hs, luego de lo cual los espermatozoides se liberaron en medio BMOC a 37° C (10<sup>7</sup> cel/ml). Dicha suspensión se inseminó en hembras prepúberes superovuladas y 48 hs. más tarde los ovocitos se recuperaron y examinaron al microscopio óptico.

Los porcentajes de fertilización obtenidos se compararon con aquellos correspondientes al mismo segmento de un epidídimo intacto (no cultivado).

concluir que los túbulos epididimarios de rata también pueden cultivarse durante 24 hs., manteniéndose tanto la morfología del tejido como la motilidad y capacidad fertilizante de los espermatozoides.

Efecto de las proteínas DE sobre la capacidad fertilizante del espermatozoide inmaduro.

La imposibilidad de identificar una zona epididimaria de transición en cuanto a capacidad fertilizante, junto al inconveniente técnico que representaba el cultivo del cuerpo distal del epidídimo, nos llevó a investigar el efecto de las glicoproteínas DE sobre espermatozoides del cuerpo proximal.

Para llevar a cabo este estudio, evaluamos la capacidad fertilizante de espermatozoides provenientes de túbulos cultivados durante 24 horas, ya sea en presencia o ausencia de 0.15 mg/ml de proteína DE.

Los resultados de una serie de 12 experimentos indicaron que los espermatozoides del túbulo tratado presentaban un porcentaje de fertilidad mayor que el obtenido para los túbulos control (7 % (7/93) y 0 % (0/100) respectivamente), si bien no significativamente diferentes entre sí, de acuerdo al análisis estadístico empleado.

Dado que concentraciones mayores de proteína no lograron modificar los resultados mencionados, nuestro próximo paso consistió en

determinar el rol biológico de las glicoproteínas DE a través del empleo de anticuerpos específicos.

Penetración de anti-DE en los túbulos cultivados y su efecto sobre la capacidad fertilizante de espermatozoides maduros.

El diseño experimental utilizado en estos estudios tuvo como objeto investigar si los anticuerpos anti-DE agregados al medio de cultivo, eran capaces de atravesar el epitelio de los túbulos epididimarios, interactuar con los espermatozoides contenidos y finalmente bloquear la capacidad fertilizante de los mismos.

Para ello túbulos de la cola distal del epidídimo se cultivaron durante 24 hs. en presencia de 0.1 mg/ml de anti-DE en el medio de cultivo. En un primer grupo de experimentos, la capacidad fertilizante de estos espermatozoides se comparó con la de aquellos provenientes de túbulos cultivados en medio 199 (Earle).

Los resultados observados para cada caso se presentan en la Tabla XVIII e indican una disminución significativa en los porcentajes de fertilización, obtenida como consecuencia del agregado de anti-DE al medio de cultivo. (16.6 % vs 52.6 %).

En este punto es importante destacar la idéntica motilidad de ambas poblaciones de espermatozoides al finalizar el período de

Tabla XVIII

Efecto del agregado de anti-DE y SCN al medio de cultivo sobre la capacidad fertilizante de los espermatozoides de rata.

Tratamiento	n	número de ovocitos observados	% promedio de fert. ± ES
control	9	80	52.6 ± 9.5
anti - DE	14	129	16.6 ± 6.4*
SCN	5	63	52.2 ± 14.1

\*  $p < 0.01$  vs. cultivado control y vs. SCN

Túbulos de la cola distal del epidídimo se cultivaron durante 24 hs en ausencia (control) o presencia de 0.1mg/ml de anti-DE o suero de conejo normal (SCN).

Finalizado el cultivo los espermatozoides se liberaron en medio BMOC a 37° C ( $10^7$  cel/ml) y alícuotas de dichas suspensiones fueron inseminadas in vivo en hembras previamente superovuladas.

Los ovocitos se recuperaron y examinaron al microscopio óptico 48 hs luego de la inseminación, calculándose los porcentajes de fertilización resultantes.

cultivo, como así también el carácter no aglutinante del anticuerpo empleado.

Para descartar un posible efecto inespecífico de las inmunoglobulinas sobre la capacidad fertilizante de los espermatozoides, determinamos los porcentajes de fertilización de espermatozoides provenientes de un túbulo de cola distal cultivado durante 24 horas en presencia de una cantidad equivalente de suero de conejo normal.

Los resultados obtenidos para este último caso (Tabla XVIII) no fueron significativamente diferentes de los hallados anteriormente para el túbulo control (52.2 % (SCN) vs 52.6 (control) ), lo cual nos permitió descartar dicha teoría.

#### Estudio inmunohistoquímico de los espermatozoides.

La verificación de la supuesta interacción entre el anticuerpo anti-DE y los espermatozoides contenidos dentro de los túbulos epididimarios se llevó a cabo mediante el empleo de una técnica inmunohistoquímica de alta sensibilidad.

Para ello espermatozoides provenientes del túbulo cultivado ya sea en presencia del anti-DE o del suero de conejo normal (control), fueron incubados durante 60' con una solución de peroxidasa anti-peroxidasa y posteriormente tratados con DAB y  $H_2O_2$  para visua-

lizar la reacción.

Cuando estas dos poblaciones de espermatozoides se examinaron al microscopio óptico, pudimos observar una intensa marcación en la cabeza de varios de los espermatozoides expuestos a la acción del anti-DE, como así también una reacción totalmente negativa para aquellos espermatozoides provenientes del túbulo control.

## DISCUSION

### Primera Parte

En la primera parte de este trabajo hemos identificado y caracterizado parcialmente un grupo de glicoproteínas sintetizadas por el epidídimo de hamster en respuesta a la estimulación androgénica y cuyas características permiten postularlas como posibles factores de maduración.

La identificación de proteínas andrógeno-dependientes se llevó a cabo a través de dos técnicas diferentes que mostraron una excelente correlación entre sí: a) electroforesis en geles de poliacrilamida de citosoles epididimarios provenientes de animales normales, castrados y reinducidos por administración de testosterona in vivo . b) síntesis in vitro de proteínas radioactivas, por incorporación diferencial de aminoácidos marcados.

La comparación entre el perfil de bandas proteicas teñibles por azul de Coomasie, correspondientes a los citosoles de epidídimos de animales normales, castrados por quince días y reinducidos por diez días, nos permitió detectar seis proteínas cuyas concentraciones resultaron dependientes de la estimulación androgénica.

La reducción de las bandas se puede detectar a los siete días luego de la orquidectomía, si bien se hace más notoria a medida que aumenta el período de castración, desapareciendo prácticamente al cabo de cuarenta y cinco días. La cuantificación de la intensidad de las bandas mediante la técnica de densitometría de geles, indicó una disminución del 40 % en la concentración de  $PE_{1-6}$  luego de 15 días de castración; cabe aclarar que el aparente aumento en el contenido de albúmina observado luego de la castración (Figura 11, A y B), probablemente esté reflejando su mayor participación en la cantidad constante de proteína sembrada (80 ug).

La administración in vivo de testosterona durante 15 días al animal castrado por treinta días logra recuperar la intensidad de las bandas hasta alcanzar los niveles observados en el animal normal, lo cual también se confirma a través de los valores hallados por densitometría y que indican una recuperación del 92% en la concentración de  $PE_{1-6}$  luego de 10 días de administración de andrógenos a un animal previamente castrado por 15 días.

Por su parte los resultados encontrados mediante la técnica de incorporación diferencial de aminoácidos marcados (Figura 9), coinciden con los hallados por tinción de geles, mostrando la inducción androgénica de la síntesis de  $PE_{1-6}$ , en magnitudes superiores



a la estimulación generalizada. Esto permite descartar por lo tanto la posibilidad de que los cambios de concentración observados anteriormente, se deban a algún mecanismo indirecto como lo sería una alteración en la permeabilidad celular.

Ambas técnicas también coincidieron aunque no totalmente respecto al grado de estimulación hallado para cada banda en relación con las restantes, ya que la tinción por geles nos muestra la mayor intensidad para las bandas PE<sub>1</sub>, PE<sub>2</sub> y PE<sub>4</sub>, y la síntesis in vitro presenta la mayor incorporación de radioactividad en los picos correspondientes a las bandas PE<sub>1</sub>, PE<sub>3</sub> y PE<sub>4</sub>.

Si bien existe una muy buena correlación entre los resultados obtenidos a través de los dos métodos utilizados, es importante destacar la presencia de dos bandas andrógeno-dependientes de Ra: 0.30 y 0.35 detectadas sólo por la técnica de tinción de geles, como así también la de un pico de estimulación de Ra: 0.40, observado únicamente mediante la técnica de síntesis in vitro. Estas discrepancias podrían explicarse considerando que las bandas de Ra: 0.30 y 0.35 podrían tener una concentración que varíe dentro del epidídimo a través de un mecanismo andrógeno-dependiente, sin necesariamente requerir de su síntesis de novo, mientras que por su parte la banda de Ra: 0.40 podría representar una cantidad de

proteína tal que no fuese detectable por la técnica de tinción.

Los resultados presentados hasta el momento y obtenidos a través de distintos ensayos demuestran la andrógeno-dependencia de  $PE_{1-6}$ , a la vez que sugieren el importante papel que las mismas podrían jugar en la maduración de los espermatozoides, teniendo en cuenta que este proceso requiere también de una adecuada estimulación androgénica. Nuestros próximos estudios se orientaron entonces a investigar más profundamente el origen de estas proteínas ya que la disminución en la concentración de  $PE_{1-6}$ , producida luego de la castración, podría explicarse suponiendo que estas proteínas se originasen en el testículo y llegaran al epidídimo a través del fluido testicular. Para descartar esta última posibilidad, se comparó el perfil proteico de un citosol de testículo con aquel presentado por un citosol epididimario, detectándose en el primero la presencia de dos bandas cuyas movilidades electroforéticas coincidieron con las correspondientes a  $PE_1$  y  $PE_4$ . Estos resultados estarían indicando un origen exclusivamente epididimario para  $PE_2$ ,  $PE_3$ ,  $PE_5$  y  $PE_6$  y un origen mixto para  $PE_1$  y  $PE_4$ . Por su parte, el estudio de las bandas proteicas presentes en otros tejidos y fluidos, reveló la ausencia de componentes con movilidades electroforéticas coincidentes con  $PE_{1-6}$ , en suero y en citosoles de próstata, vesículas semi

nales, hígado y músculo. Finalmente la persistencia de las bandas luego de la castración, aún cuando los espermatozoides prácticamente han desaparecido del órgano, junto a la reinducción de las bandas mediante la terapia de restitución en el animal castrado, nos permiten descartar el hecho de que estas proteínas provengan simplemente del material liberado por los espermatozoides a la fracción citosólica, durante el manipuleo del tejido.

Con el fin de determinar si las proteínas PE<sub>1-6</sub> sintetizadas por el tejido eran o no secretadas a la luz tubular, decidimos investigar la presencia de estas bandas en el fluido epididimario. El análisis del mismo, mediante la técnica de electroforesis, nos indicó la naturaleza secretoria de PE<sub>1</sub>, PE<sub>3</sub> y PE<sub>4</sub>. La secreción de proteínas epididimarias ha sido demostrado en distintas especies (157, 162, 172), sin embargo aún no ha podido definirse claramente su origen, puesto que parecen existir algunas discrepancias entre los hallazgos morfológicos y bioquímicos de la función secretoria del epitelio epididimario. Es así que si bien se ha demostrado que las células principales contienen abundantes organelas típicas de las células secretorias activas, tales como un desarrollado retículo endoplasmático rugoso y un importante aparato de Golgi, los estudios ultraestructurales no han podido revelar la presencia de gránu

los secretorios en el citoplasma celular, como así tampoco su liberación (298, 299, 300, 8 y 301). De todos modos hay suficientes evidencias histoquímicas (302) y bioquímicas (21, 303, 304, 81, 305, 306 y 307) que indican que el epidídimo se comportaría autónomamente en la creación de su medio interno.

Teniendo en cuenta que la membrana plasmática parece ser el sitio donde ocurren la mayor parte de los cambios observados durante este proceso de maduración, decidimos dedicarnos al estudio de la interacción de nuestras proteínas con la superficie de los espermatozoides que transitan por el epidídimo. La interacción de las PE<sub>1-6</sub> con los espermatozoides fue sin lugar a dudas un punto fundamental dentro de nuestros estudios, ya que el objetivo de este trabajo consistía en la identificación de factores capaces de inducir la maduración de los espermatozoides. Aunque este tipo de interacción ha sido bien estudiado en algunas especies como la rata (151, 161, 170), el toro (173) o el carnero (154), los únicos datos que se conocen hasta el momento en el hamster, son aquellos presentados por Moore (172), quien demuestra la secreción de dos proteínas epididimarias H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub>, una de las cuales (H<sub>1</sub>) resultó ser andrógeno-dependiente y capaz de asociarse a la superficie de los espermatozoides. Nuestros resultados, obtenidos mediante la técnica de elec

troforesis, indicaron la ausencia completa de  $PE_{1-6}$  entre las proteínas extraídas tanto de espermatozoides testiculares como de aquellas provenientes de las regiones proximales del epidídimo (cabeza y cuerpo proximal), encontrándose en cambio para los espermatozoides de cuerpo y cola distal, cantidades apreciables de dos proteínas cuyos  $R_a$  coincidieron con los correspondientes a  $PE_2$  y  $PE_3$ . El hecho de que  $PE_2$  se haya encontrado asociada a los espermatozoides, sin haber sido identificada previamente como proteína secretoria, podría deberse a una interacción suficientemente rápida y eficiente de ésta proteína con los espermatozoides de modo tal que impidiera su detección en el fluido epididimario. Tal como se señalara oportunamente en la descripción de los resultados, la gran abundancia de  $PE_2$  eluída de los espermatozoides de la cola del epidídimo, como así también su proximidad a la banda correspondiente a la albúmina, nos llevó a pensar que esta proteína podría provenir de una modificación de la albúmina ocasionada por el tratamiento salino empleado o bien por la acción proteolítica de las enzimas liberadas por los espermatozoides durante el proceso de extracción de proteínas. Sin embargo, la imposibilidad de modificar la movilidad electroforética de la albúmina de un citosol epididimario, ya sea mediante el empleo del tratamiento salino, o bien por la acción de un inhibidor de tripsina, nos permitió

descartar momentáneamente esta teoría. No obstante, se prevee llevar a cabo una corroboración definitiva a través del uso de anticuerpos específicos.

La elución de PE<sub>2</sub> y PE<sub>3</sub> recién a partir de los espermatozoides del cuerpo y cola distal del epidídimo, coincide con observaciones realizadas previamente en el epidídimo de rata por Olson y Hamilton (151) y Kohane y colaboradores (279) quienes hallaron que los espermatozoides de la cola epididimaria contenían cantidades significativamente mayores de proteínas asociadas a su superficie, que aquellos recuperados de la cabeza del órgano. Otro estudio realizado en la misma especie, utilizando inmunofluorescencia indirecta sobre cortes de tejido, indicó que dicha asociación, se produciría apenas las proteínas son secretadas al lumen, permaneciendo unidas a los espermatozoides a lo largo de todo su tránsito por el órgano (176). Un elemento confirmatorio de esta observación lo constituyen los resultados hallados por el grupo de Lea y colaboradores (170) quienes identificaron una glicoproteína acídica epididimaria (AEG), que recubre a los espermatozoides de todos los segmentos distales a la cabeza. Si bien nuestros resultados en hamster no nos permiten asegurar una interacción gradual de las proteínas PE<sub>2</sub> y PE<sub>3</sub> con la superficie de los espermatozoides, es muy probable que en esta especie ocurra

un fenómeno de tipo similar al descrito en la rata. Esto podría explicarse si consideramos que la técnica de tinción de geles, debido a su baja sensibilidad, no sería capaz de detectar cantidades de proteínas menores que aquellas extraídas del cuerpo y de la cola distal del epidídimo.

La unión de PE<sub>2</sub> y PE<sub>3</sub> a la superficie de los espermatozoides de cola distal no resultó ser demasiado fuerte, tal como lo sugiere la similitud cualitativa y cuantitativa de las proteínas extraídas ya sea con baja (0.25 M) o alta (0.5 M) fuerza iónica. De todos modos no podemos descartar la posibilidad de que parte de las proteínas permanezcan asociadas a los espermatozoides luego de la extracción salina, lo cual estaría de acuerdo con los resultados obtenidos previamente en la rata (279), sugiriendo la existencia de dos poblaciones diferentes de proteínas epididimarias asociadas a los espermatozoides. Una de ellas, al igual que en el hamster, extraíble de los espermatozoides de cuerpo y cola del epidídimo con concentraciones 0.25 M y 0.5 M de ClNa y otra que correspondería a las proteínas remanentes y no extraíbles aún con mayores cantidades de sal. Cabe aclarar sin embargo, que esta última población de proteínas, pudo detectarse gracias al empleo de la técnica de fijación de complemento que permite la medición de las proteínas aún cuando las mismas se encuentran unidas a los espermatozoides. Aunque las evidencias no son aún

definitivas, los estudios realizados hasta el momento sugerirían que los espermatozoides del hamster adquieren su completa "dotación" de proteínas, en el momento en que alcanzan la región de la cola proximal del epidídimo. La importancia de este hecho radica en que justamente es en esta región donde los espermatozoides comienzan a mostrar su máxima capacidad fertilizante (77) como resultado del proceso de maduración. Estos resultados coincidirían con aquellos presentados previamente por Moore (172) señalando la concomitancia entre la adquisición de fertilidad y la aparición de glicoproteínas asociadas a los espermatozoides epididimarios de conejo. No parece existir en cambio una relación tan directa entre la secreción de glicoproteínas y su asociación a los espermatozoides. Es probable que en la transferencia de antígenos desde el epitelio a los espermatozoides participen otros compuestos (transferasas), que se secreten recién en regiones más distales del epidídimo. Moore encuentra sin embargo que la concomitancia entre la asociación de proteínas a los espermatozoides y la adquisición de capacidad fertilizante no es tan obvia en el hamster como en el conejo, ya que si bien la asociación con los espermatozoides ya es detectable desde la cabeza proximal del epidídimo, la adquisición de capacidad fertilizante recién se manifiesta en la cola proximal.



Habiendo determinado la asociación de estas proteínas a la superficie de los espermatozoides epididimarios, consideramos que sería de interés estudiar la presencia de las mismas en el tejido en función de la edad del animal, a fin de establecer una correlación entre la aparición de las proteínas y el estado funcional del tracto reproductivo. Los resultados, examinados a través de la tinción de geles de poliacrilamida, nos indicaron la presencia de  $PE_{1-5}$  en los citosoles epididimarios provenientes de animales de 23, 30, 45, 60 y 90 días de edad. Este resultado diferiría en parte de los obtenidos en la rata, ya que en este caso la concentración de PEE, recién detectables a los veinte días, aumenta gradualmente con la edad hasta obtenerse a los 90 días los valores correspondientes al animal adulto. Es importante destacar que la presencia de espermatozoides en el epidídimo del hamster, recién pudo detectarse en el animal de 45 días de edad, sin embargo, las dos proteínas capaces de asociarse a los espermatozoides, es decir  $PE_2$  y  $PE_3$ , fueron detectables desde los 23 días de edad, lo cual nos estaría indicando que la síntesis de las mismas sería previa a la presencia de espermatozoides en el epidídimo. Para que un antígeno esté involucrado en el proceso de maduración de los espermatozoides, su producción debe haberse completado en el momento en que los espermatozoides entran al epidídi-

mo, y ese es precisamente el caso de las proteínas que estudiamos. Nada podemos decir a partir de estos experimentos, acerca del momento que estas proteínas se secretarían a la luz tubular, como así tampoco desde qué edad aparecerían asociadas a los espermatozoides. Para ello se haría necesario un análisis de los fluidos epididimarios y de las proteínas extraídas de espermatozoides provenientes de animales de diferentes edades. Debido a las dificultades técnicas que és to implica, se prevee la realización de estos experimentos mediante ensayos más precisos y sensibles, como lo son la fijación de complemento o la inmunofluorescencia, una vez que las proteínas y sus anticuerpos específicos se encuentran purificados.

Una vez establecida la síntesis andrógeno-dependiente de PE<sub>1-6</sub>, la secreción de alguna de ellas al lumen epididimario y la posible asociación de PE<sub>2</sub> y PE<sub>3</sub> a la superficie de los espermatozoides, consideramos que un aspecto que completaría nuestros estudios sería la caracterización de estas proteínas. Los resultados positivos obtenidos luego del ensayo de tinción de PAS, nos revelaron la naturaleza glicoproteica de PE<sub>1-6</sub>, tal como ocurre con la mayoría de las proteínas epididimarias descritas en distintas especies. La interacción de estas glicoproteínas con los espermatozoides epididimarios, podría explicar entonces muchos de los cambios de superficie que ocurren

durante el proceso de maduración de los espermatozoides, tales como la adquisición de antígenos de superficie (146), el aumento en el número y distribución de sitios de unión de lectinas (147, 148) y el marcado incremento de la carga negativa de superficie (140, 141). La proporción de hidratos de carbono presente en cada una de las proteínas parecería ser baja a juzgar por la intensidad del color observado en las bandas, de todos modos sería necesario contar con las proteínas ya purificadas para la realización de ensayos más exactos que confirmasen esta suposición. Es así como en nuestro laboratorio, Garberi y colaboradores (274) utilizando la técnica de cromatografía gas-líquido, determinaron que la proteína DE de rata (previamente purificada hasta un 95 %) contenía un 10,5 % de hidratos de carbono, describiendo también la composición porcentual de oligosacáridos presentes. La importancia fundamental de haber identificado las PE<sub>1-6</sub> como glicoproteínas, radica en la conocida participación de este tipo de moléculas en los distintos fenómenos de reconocimiento intercelular (308, 309), entre las cuales se encuentra, el que ocurre entre ovocitos y espermatozoides.

La determinación del peso molecular de la PE<sub>1-6</sub> mediante el análisis de regresión lineal de Ferguson, indicó un peso molecular de 61.500 para PE<sub>1</sub>, 42.500 para PE<sub>2</sub>, 23.800 para PE<sub>3</sub>, 20.400 pa-

ra  $PE_4$ , 26.100 para  $PE_5$  y 41.000 para  $PE_6$ . Si hacemos un análisis comparativo de los pesos moleculares hallados para las proteínas c-pididimarias identificadas en las distintas especies, podemos concluir que es un hecho prácticamente constante, la existencia de una proteína capaz de asociarse a los espermatozoides, con un peso molecular que oscila entre 37.000 y 40.000 según el caso. Al respecto, diversos autores han identificado una proteína de peso molecular 37.000 que puede eluirse de los espermatozoides de rata (151, 161, 171), de toro (173) y de carnero (154). Otros autores sin embargo, han encontrado pesos moleculares un poco menores para este tipo de proteínas, como ocurre para la proteína AEG de rata (170) de peso molecular 33.000, o bien mayores como es el caso de la proteína que interactúa con los espermatozoides de carnero, de peso molecular 40.000 (154). La única proteína de hamster que por sus características podría relacionarse con las que acabamos de describir, sería  $PE_2$  cuyo peso molecular fue estimado en 42.500. Este valor, ligeramente mayor que los restantes, podría deberse a que  $PE_2$ , por ser una glicoproteína, presentara una movilidad electroforética anómala (310), introduciendo de este modo un error en la determinación de su peso molecular. La proteína  $PE_6$  en cambio, si bien presenta un peso molecular más cercano a los mencionados (41.000), no ha sido detectada entre las

proteínas extraídas de espermatozoides. La segunda proteína que se encuentra asociada a los espermatozoides de hamster en cantidades apreciables, es  $PE_3$ , con un peso molecular de 23.800. Esta proteína sería análoga a una proteína de peso molecular 24.000, descrita como el componente más importante que se eluye de los espermatozoides de la cola epididimaria del carnero (154). La proteína C, integrante principal del conjunto de PEE identificadas en la rata por Cameo y Blaquier (161), también podría relacionarse con  $PE_3$  puesto que interactúan con los espermatozoides epididimarios y posee un peso molecular de 22.000. Finalmente, podría establecerse una analogía, quizás no tan clara como en los restantes casos, entre la  $PE_1$  de peso molecular 61.400 y las proteínas de peso molecular 68.000 y 67.000, que interactúan con los espermatozoides de conejo (172) y toro (173) respectivamente.

## DISCUSION

### Segunda Parte

Los diversos estudios descriptos en la 2da. parte de este trabajo han brindado nuevas evidencias en favor de la participación de las proteínas epididimarias andrógeno-dependientes en el proceso de maduración de los espermatozoides. Tal como ha sido mencionado anteriormente, durante dicho proceso los espermatozoides sufren una serie de alteraciones morfológicas, fisiológicas y bioquímicas que culminan con la adquisición de su capacidad fertilizante. Sin embargo, puesto que para fertilizar a un ovocito el espermatozoide debe ser capaz de reconocer y unirse a la zona pelúcida del mismo, la capacidad de reconocimiento de un espermatozoide puede considerarse un parámetro indicativo de su grado de maduración.

Desde un punto de vista bioquímico, la interacción inicial entre un espermatozoide y un ovocito, puede ser considerada como un caso de reconocimiento y adhesión intercelular altamente específico, mediado por estructuras complementarias presentes en ambas gametas. La existencia de una estructura receptora como la descrita, ha tenido su origen en la identificación de una proteína acrosomal, denominada "bindina" (PM: 30.500), responsable del reconocimiento y adhesión de los espermatozoides a los ovocitos de erizo de

mar (311). El receptor complementario presente en el ovocito, fue propuesto inicialmente por Aketa y colaboradores en 1977 (312), al demostrar que algunos componentes glicoproteicos de la capa vitelina del ovocito presentaban actividad receptora para los espermatozoides. Un año más tarde Glabe y Vacquier (313) aislaron un complejo glicoproteico capaz de interactuar específicamente con la bindina de los espermatozoides, y recientemente se ha demostrado que este glicoconjugado es un polisacárido de alto peso molecular, conteniendo xilosa, galactosa y glucosa en su estructura (314).

A pesar de la creciente comprensión de los mecanismos bioquímicos involucrados en el reconocimiento entre gametas de invertebrados y organismos inferiores, es poca la información disponible en lo que concierne a las bases moleculares del reconocimiento entre espermatozoides y ovocitos de mamíferos. Las primeras evidencias acerca de un receptor para espermatozoides, presente en la zona pelúcida de los ovocitos de mamíferos, fue presentada por Gwatkin y Williams en 1977 (246) y confirmada por Bleil y Wasserman en 1980 (315) a través del aislamiento de una glicoproteína de zona pelúcida del ovocito de ratón ( $ZP_3$ ), con actividad receptora para espermatozoides. Por su parte, la existencia de un receptor para zona pelúcida presente en la superficie de las gametas masculinas fue pos

tulada por Peterson (316) y Yanagimachi (317) para los espermatozoides de cerdo y cobayo respectivamente. Estos resultados, sumado a la gran cantidad de evidencias que indican que los carbohidratos de la superficie celular actúan como determinantes específicos del reconocimiento y adhesión célula-célula (310, 311) nos permiten sugerir que las glicoproteínas secretadas por el epidídimo y capaces de interactuar con los espermatozoides, jueguen un rol clave en el reconocimiento entre gametas. En base a ello este trabajo se ha orientado hacia el establecimiento de la relación existente entre las glicoproteínas PE<sub>1-6</sub> y la capacidad de reconocimiento de los espermatozoides de hamster.

El desarrollo de un ensayo mediante el cual se determina el número de espermatozoides unidos específicamente a la zona pelúcida del ovocito, nos permitió evaluar la capacidad de reconocimiento de espermatozoides provenientes de los sucesivos segmentos epididimarios. Los resultados obtenidos en este estudio indicaron que mientras los espermatozoides de la cabeza del órgano eran totalmente incapaces de reconocer y unirse a la zona pelúcida del ovocito, dicha capacidad ya estaba presente en una pequeña proporción de espermatozoides del cuerpo proximal, aumentando abruptamente en el cuerpo distal del epidídimo hasta valores semejantes a los hallados



para la cola distal. Este aumento en la capacidad de reconocimiento de los espermatozoides a medida que los mismos descienden por el epidídimo, también ha sido observado en otras especies tales como el ratón (318) y el carnero (319) pudiendo ser el resultado del enmascaramiento o transformación de una estructura receptora ya presente en el espermatozoide, o bien del agregado de algún componente a la superficie de los espermatozoides, con actividad receptora por la zona pelúcida del ovocito.

Los diversos mecanismos que acabamos de mencionar nos han llevado a postular que las glicoproteínas  $PE_{1-6}$  podrían intervenir en el proceso de maduración a través de la formación o activación de un receptor para zona pelúcida presente en la superficie del espermatozoide de hamster. Para corroborar esta hipótesis desarrollamos un sistema de cultivo de órgano mediante el cual es posible mantener, luego de 24 hs, no sólo la morfología del tejido (Figura 16 A y B) sino la motilidad (Tabla VI) y viabilidad (Tabla VII) de los espermatozoides contenidos. Nuestros primeros resultados muestran que la respuesta de los túbulos en cultivo, a la estimulación androgénica in vitro, es cualitativamente similar a aquella encontrada mediante la administración de Testosterona in vivo a animales castrados, dado que se produce la síntesis de seis proteínas cuyos  $R_a$  coinciden con los de las

PE<sub>1-6</sub> previamente identificadas. Este aumento en la actividad sintética, producido por el agregado de 5  $\mu$ -DHT al medio de cultivo, también se vió reflejado en las características morfológicas del tejido estimulado, cuyas células epiteliales presentaron al microscopio óptico, un aspecto de franca actividad (Figura 17 A, B, C, D), además de un tamaño significativamente mayor al de aquellos correspondientes al túbulo control (Tabla VIII). El hecho de que la inducción se haya producido preferentemente en los túbulos proximales del epidídimo coincide con resultados previos de nuestro laboratorio que demuestran que la cabeza del epidídimo de rata es la región más activa en términos de producción de proteínas andrógeno-dependientes (176).

Es importante destacar la presencia de cinco proteínas radioactivas asociadas a los espermatozoides de los túbulos estimulados, las cuales presentaron Ra coincidentes con las proteínas sintetizadas por el tejido en cultivo. Estos resultados no sólo apoyarían la naturaleza secretoria de PE<sub>1-6</sub> sino que confirmarían la supuesta interacción de las mismas con los espermatozoides durante el proceso de maduración. No obstante, el aspecto más relevante de nuestros resultados lo constituye el hecho de que la población de espermatozoides proveniente de los túbulos expuestos al andrógeno haya aumentado significativamente su capacidad de reconocer al ovocito, en forma con

comitante con la asociación de las glicoproteínas epididimarias a su superficie. El aumento de la capacidad de reconocimiento producido por la  $5\alpha$  DHT, podría deberse a un efecto directo de los andrógenos sobre los espermatozoides, o bien a la modificación del entorno epididimario producida por la acción de la hormona sobre el tejido. El hecho de que los espermatozoides de hamster retenidos en los segmentos proximales del epidídimo permanezcan inmaduros aún luego de haber estado en contacto con un medio rico en andrógenos (77), estaría apoyando el segundo esquema y con ello la posibilidad de que  $PE_{1-6}$  hayan mediado la acción androgénica.

La especificidad del efecto estimulador de la  $5\alpha$ -DHT, se deduce a partir de la falta de respuesta observada al utilizar otros andrógenos tales como el  $3\alpha$  o  $3\beta$  androstandiol y por la disminución significativa de la capacidad de reconocimiento que se produce al agregar simultáneamente  $5\alpha$  DHT y el antiandrógeno acetato de ciproterona al medio de cultivo. Por otra parte el aumento en la capacidad de reconocimiento producido por la  $5\alpha$  DHT también fue bloqueado por el agregado de un inhibidor de la síntesis proteica (cicloheximida), lo cual estaría indicando que las proteínas sintetizadas de ново serían los verdaderos mediadores de la acción hormonal.

Finalmente nuestros resultados demuestran que el agregado

directo de un extracto proteico enriquecido en PE<sub>1-6</sub> al medio de cultivo, es capaz de reproducir el aumento en la capacidad de reconocimiento obtenido previamente por la 5  $\alpha$  -DHT, si bien no podemos descartar la posibilidad de obtener un efecto más notorio mediante el empleo de mayores cantidades de la fracción enriquecida o bien de las proteínas PE<sub>1-6</sub> ya purificadas. El aumento observado en nuestro caso no sería debido a los andrógenos endógenos de la preparación epididimaria, puesto que como ya hemos aclarado oportunamente, la concentración androgénica de la misma resultó ser 4 órdenes de magnitud menor que la requerida para aumentar la unión de espermatozoides a la zona pelúcida. Sin embargo, el argumento más definitivo en favor de la especificidad del efecto proteico, está dado por los diferentes resultados que se obtienen al utilizar las fracciones epididimarias provenientes de animales normales o castrados. La menor contribución de las proteínas PE<sub>1-6</sub> en el extracto epididimario de animal castrado respecto del normal (8% castrado vs 30% normal), sin encontrarse disminuídas las restantes proteínas, sugiere finalmente que las PE<sub>1-6</sub> serían los factores responsables del efecto observado. De todos modos la hipótesis de que estas glicoproteínas participen en la formación y/o activación de un receptor para zona pelúcida, requeriría pruebas más concretas de la presencia de estas proteínas

en la superficie de los espermatozoides, como así también de su afinidad por la zona pelúcida del ovocito. Un dato confirmatorio de nuestros resultados lo constituye la reciente comunicación de Sullivan y colaboradores (320) quienes detectaron a través de la técnica de radioautografía, que las proteínas de zona pelúcida marcadas con  $I^{125}$  se unían preferencialmente a una proteína de PM 24.000 extraída de la superficie de espermatozoides de la cola del epidídimo del hamster. La analogía existente entre esta proteína y la proteína PE<sub>3</sub> (PM: 23.800) descrita en la primera parte de este trabajo, representa una nueva evidencia en favor de la propuesta participación de las glicoproteínas epididimarias PE<sub>1-6</sub> en los mecanismos de adquisición de capacidad de reconocimiento.

Por otra parte, nuestros resultados estarían de acuerdo con los hallados previamente por Orgebin-Crist y Jahad (277) quienes demostraron que la capacidad fertilizante de espermatozoides de conejo, provenientes de túbulos cultivados del cuerpo proximal, podía ser incrementada a través del agregado de un citosol epididimario al medio de cultivo. Esta similitud entre los resultados obtenidos en conejo y en hamster, nos permiten sugerir que el papel propuesto para las proteínas epididimarias en el proceso de maduración, podría ser común a diversas especies. El hecho de que estos autores hayan obser-

vado que el extracto citoplasmático proveniente del cuerpo del epidídimo era más efectivo en aumentar la capacidad fertilizante que aquel proveniente de la cola del órgano, estaría nuevamente de acuerdo con la identificación de los segmentos proximales del epidídimo como los principales sitios de producción de proteínas que posteriormente se asocian a los espermatozoides (176).

Para estudiar la participación de  $PE_{1-6}$  en la adquisición de capacidad fertilizante determinamos los porcentajes de fertilización correspondientes a los sucesivos segmentos del epidídimo. Si bien este tipo de estudios había sido llevado a cabo por Horan y Bedford (77) en el epidídimo del Syrian hamster, consideramos necesario realizarlo en nuestra colonia de animales (Golden hamster) debido a las variaciones que pudieran existir entre las diferentes cepas utilizadas. Los resultados obtenidos en este estudio indicaron que la capacidad fertilizante de los espermatozoides comenzó a desarrollarse en el cuerpo distal del epidídimo (13%) hasta alcanzar un valor del 72% en la cola proximal que no difiere significativamente del correspondiente a la cola distal (87%). Estos porcentajes prácticamente coinciden con los hallados por Horan y Bedford (77) excepto en lo que concierne al cuerpo proximal del epidídimo, para el cual estos autores asignaron un 3% de fertilización a diferencia del 0% obtenido en nuestro caso.

Tal como puede observarse existe un paralelismo entre la adquisición de la capacidad fertilizante y la capacidad de reconocimiento que ocurre a medida que los espermatozoides descienden por el epidídimo. Este paralelismo, también encontrado por Saling en el ratón (318) y por Fournier-Delpech en el carnero (319), no sólo refuerza la validez de utilizar a la capacidad de reconocimiento como un índice del grado de maduración de los espermatozoides sino que sugiere que la adquisición de capacidad fertilizante podría ser una consecuencia de la aparición de la capacidad de reconocimiento. Sin embargo, puesto que un cierto porcentaje de espermatozoides provenientes del cuerpo proximal del epidídimo de hamster, pueden reconocer y unirse a la zona pelúcida del ovocito, (tabla III) sin ser aún capaces de fertilizarlo (Tabla IV), es probable que la adquisición de la capacidad de reconocimiento, sea una condición necesaria pero no suficiente para que los espermatozoides adquieran la capacidad de fertilizar a un ovocito.

Varios autores han demostrado que el perfil de fertilidad del epidídimo de conejo puede ser alterado mediante ligaduras que provocan la aparición de espermatozoides fértiles en regiones más proximales del epidídimo (81, 321). Por el contrario, la retención de espermatozoides durante 5 días en los segmentos proximales del epidídimo

del hamster (H , B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>) si bien produce una mayor motilidad y una mayor tendencia a la autoaglutinación cabeza-cabeza, es incapaz de aumentar su capacidad fertilizante (77), indicando así que el proceso de maduración en el epidídimo del hamster depende en gran medida del pasaje de los espermatozoides por regiones específicas del órgano. Esta suposición estaría de acuerdo con el hecho de que ni los andrógenos ni la fracción enriquecida en PE<sub>1-6</sub> hayan logrado aumentar la capacidad fertilizante de los espermatozoides del cuerpo proximal (B<sub>1</sub>), mientras que por el contrario, resultados recientemente obtenidos en nuestro laboratorio indican que la exposición de espermatozoides del cuerpo distal a dicha preparación, produce un aumento significativo en el porcentaje de ovocitos fertilizados tanto in vivo como in vitro (322). En conjunto esta serie de observaciones nos llevan a concluir que la maduración de los espermatozoides sería el resultado de la acción acumulativa de varios factores producidos a distintos niveles del epidídimo.

Las evidencias halladas acerca del rol biológico de PE<sub>1-6</sub>, sumado a la disponibilidad de una preparación purificada de DE, como así también de sus anticuerpos específicos, nos impulsó a extender nuestros hallazgos a la rata, evaluando la participación de estas proteínas en el proceso de maduración. Los primeros experimentos rea-



lizados en esta especie tuvieron como objeto desarrollar un ensayo de unión específica de espermatozoides a la zona pelúcida de los ovocitos mediante el cual seleccionar la población de espermatozoides más adecuada para el estudio del efecto de DE sobre la capacidad de reconocimiento. A pesar de las numerosas condiciones experimentales ensayadas, tanto en lo que se refiere al tratamiento previo de una como de otra gameta, no pudimos detectar espermatozoides de rata unidos a la zona pelúcida de ovocitos homólogos o heterólogos (de hamster). Esta incapacidad que presentan los espermatozoides de rata para unirse a la zona pelúcida de ovocitos heterólogos, concuerda con los resultados presentados por Peterson (316), quien observa que mientras los espermatozoides de jabalí, hamster y toro, y en menor medida los de humano y cobayo lograron unirse a la zona pelúcida de ovocitos de cerdo, ningún espermatozoide de rata fue capaz de unirse a dichos ovocitos. Contrariamente, los ovocitos de rata son capaces de interactuar con espermatozoides heterólogos, tal como lo demuestran Fournier-Delpech y colaboradores (319) al emplear ovocitos de esta especie para estudiar la adquisición de capacidad de reconocimiento de los espermatozoides de carnero durante el proceso de maduración. Bedford (323) y posteriormente Schmell y colaboradores (324) realizaron estudios acerca de la interacción heteróloga entre espermatozoides y ovo-

bitos de diversas especies de mamíferos que incluyeron al hombre, el mono rhesus, el conejo, el ratón, el hamster y el cobayo, observando en todos los casos una escasa especificidad de especie. Es sugestivo el hecho de que ninguno de estos trabajos haya incluido a la rata entre las numerosas especies estudiadas, como lo es también la falta de evidencias que se tiene hasta el momento acerca de la unión de espermatozoides de rata a ovocitos homólogos. Finalmente es importante señalar que aún siendo la rata uno de los animales más utilizados, tanto en el campo de la endocrinología como en el de la biología de la reproducción, ningún grupo de investigación ha logrado reproducir la técnica de fertilización in vitro descrita por Toyada y Chang en 1974 (224) para la rata. Al respecto cabe citar los comentarios realizados por estos mismos autores indicando que "de acuerdo a su experiencia personal los espermatozoides de rata son extremadamente sensibles a cambios del medio, tales como la temperatura, dilución y otros factores hasta el momento desconocidos" (325).

Contrariamente a lo ocurrido con el ensayo de unión de espermatozoides a la zona pelúcida de los ovocitos, la técnica de inseminación in vivo empleada anteriormente en el hamster, pudo aplicarse sin mayores inconvenientes a la rata, aunque con ligeras modificaciones en cuanto a los horarios de observación y criterios de fertilización

elegidos (Tabla XV). Mediante esta técnica evaluamos la capacidad fertilizante de espermatozoides de los diferentes segmentos del epidídimo, obteniendo un 0% de fertilización para las regiones de la cabeza y cuerpo proximal y un 40% y 55% para la cola proximal y distal respectivamente (Tabla XVI). Por su parte el cuerpo distal presentó porcentajes de fertilización o bien totalmente nulos o bien tan elevados como los del segmento posterior, lo cual estaría indicando que la capacidad fertilizante de los espermatozoides de rata, aumentaría abruptamente al llegar a una determinada región comprendida entre el cuerpo distal y la cola proximal del epidídimo. Nuestros resultados prácticamente coinciden con los presentados por Dyson y Orgebin-Crist (47) quienes obtuvieron un 0% de fertilización para la cabeza del epidídimo de rata, un 6% para la región del cuerpo (cuerpo proximal + cuerpo distal), un 48% para la cola proximal y un 57% para la cola distal, concluyendo como en nuestro caso, que la mayoría de los espermatozoides adquirirían su capacidad fertilizante recién al alcanzar la región de la cola proximal.

Este aumento de la capacidad fertilizante de los espermatozoides a medida que descienden por el epidídimo, ha sido observado en todas las especies de mamíferos estudiadas hasta el momento, si bien tal como se mencionara en la introducción, la región en la cual

los espermatozoides adquieren dicha capacidad, no parecería ser la misma en cada caso. Es así que en algunas especies tales como el conejo (74, 82) y el carnero (84), los espermatozoides adquieren su capacidad fertilizante al llegar al cuerpo distal del epidídimo, mientras que en otras especies como el hamster y la rata dicha capacidad se adquiere recién en la cola proximal. De todos modos en casi todas las especies la capacidad fertilizante aumenta abruptamente en la región del cuerpo distal, exceptuando el caso del cerdo, en el cual parece haber un aumento regular y gradual desde la cabeza a la cola epididimaria (326).

El paralelismo encontrado entre la adquisición de capacidad fertilizante y el aumento del contenido DE sobre la superficie de los espermatozoides (279) nos llevó a postular la existencia de una estructura necesaria para la fertilización y en cuya formación y/o activación participarían estas glicoproteínas epididimarias. Para confirmar la participación de DE en el proceso de adquisición de capacidad fertilizante decidimos emplear el sistema de cultivo desarrollado anteriormente. Tal como ocurrió para el caso del hamster, los túbulos provenientes de los distintos segmentos del epidídimo de rata, exceptuando el cuerpo distal, pudieron mantenerse durante 24 hs. en cultivo, sin que se viera afectada la morfología del tejido, ni la motilidad

y viabilidad (Tabla XVII) de los espermatozoides. Los inconvenientes que presentaba el cultivo de la región del cuerpo distal, sumado a la imposibilidad de identificar una región de transición en cuanto a capacidad fertilizante se refiere, nos llevaron a investigar el efecto de DE sobre espermatozoides inmaduros del cuerpo proximal. Los resultados obtenidos en este estudio indicaron que el agregado de DE al medio de cultivo produjo un aumento de la capacidad fertilizante de los espermatozoides, aunque no significativo respecto del control (7% vs 0% respectivamente). Es probable que el proceso de maduración de los espermatozoides de rata, al igual que en el hamster, requiera factores adicionales presentes recién en regiones más distales y específicas del epidídimo. De todos modos, si bien el aumento de la capacidad fertilizante obtenido por el agregado de DE no es concluyente, la propuesta participación de dichas proteínas en el proceso de fertilización estaría apoyada por los resultados obtenidos posteriormente mediante el empleo del anticuerpo anti-DE. En los últimos años, gran parte de la información referente a los mecanismos de fertilización en mamíferos, ha sido obtenida mediante el uso de anticuerpos dirigidos contra antígenos presentes en la superficie de ambas gametas. La razón por la cual este tipo de estudios fue realizado en nuestro caso utilizando el sistema de cultivo, se debió fundamentalmente a la dificultad de man-

tener la motilidad y viabilidad de los espermatozoides de rata, fuera del túbulo epididimario. El esquema experimental elegido consistió entonces en el cultivo de túbulos de la cola distal del epidídimo, mantenidos durante 24 hs en contacto con un medio al que se había agregado o no el anticuerpo anti-DE. Los resultados indicaron que el porcentaje de fertilización de espermatozoides provenientes del túbulo tratado fue significativamente menor que aquel correspondiente al túbulo control (16.6% vs 52.6% respectivamente). El efecto inhibitorio del anti-DE resultó ser específico puesto que la presencia de suero preinmune (SCN) en el medio de cultivo no fue capaz de bloquear la capacidad fertilizante de los espermatozoides, obteniéndose un porcentaje de fertilización (52.2%) que no fue significativamente diferente del control. Esta disminución del porcentaje de fertilización producido por el anti-DE estaría sugiriendo que las moléculas de anticuerpo fueron capaces de penetrar el túbulo epididimario y afectar de alguna manera la capacidad fertilizante de los espermatozoides. La entrada del anticuerpo al lumen tubular parecería en principio poco probable, si se tiene en cuenta que el pasaje de componentes desde la circulación sistémica al lumen de la cabeza y la cola del epidídimo de rata, está aparentemente determinado por el peso molecular de la entidad en cuestión. Es así que moléculas de gran tamaño como la inulina o albúmina sérica bovina no alcanzan a llegar al 5 % de la

concentración sanguínea, mientras que moléculas de agua tritiada se equilibran libremente con el compartimiento tubular (327). Sin embargo debemos mencionar los resultados obtenidos recientemente por Weininger y colaboradores (328), quienes utilizando una técnica de radioinmunoensayo altamente sensible y específica, determinaron el grado en el que las IgG son capaces de alcanzar el fluido del lumen de la cola del epidídimo de conejo. Estos autores encuentran que las IgG alcanzan el lumen tubular aunque en concentraciones mucho menores que las presentes en el suero. Los cálculos basados en la concentración absoluta de IgG del fluido epididimario, en relación con el número total de espermatozoides y el volumen estimado del fluido, indicaron aproximadamente 40.000 moléculas de anticuerpo por espermatozoide, concluyendo de este modo que si bien existe una barrera al pasaje de anticuerpos desde el suero al lumen del epidídimo, dicha barrera no excluiría a las IgG como se había supuesto previamente.

Admitiendo la posible entrada del anti-DE desde el medio de cultivo al lumen tubular, restaría investigar el mecanismo a través del cual este anticuerpo bloquea la capacidad fertilizante de los espermatozoides. Dos probables explicaciones de la inhibición observada serían: 1) acción inespecífica del anticuerpo a través de la aglutinación y/o inmovilización de los espermatozoides. 2) bloqueo de re-

ceptores específicos para el ovocito, presentes en la superficie de los espermatozoides. Puesto que el agregado de anti-DE a una suspensión de espermatozoides de rata no produce aglutinación y/o inmovilización de los espermatozoides ni afecta su motilidad, podemos descartar la posible inhibición de la capacidad fertilizante por un efecto inespecífico del anticuerpo. El comportamiento de los espermatozoides en presencia del anticuerpo bivalente anti-DE coincidió con las observaciones de Yanagimachi y colaboradores (319) quienes describen que los espermatozoides de cobayo se mantienen como células individuales y se mueven libremente aún luego de su interacción con anticuerpos bivalentes dirigidos contra antígenos de la superficie de los espermatozoides. Por el contrario Tzartos (329) observa que los espermatozoides de hamster se aglutinan en presencia de los anticuerpos bivalentes anti-espermatozoides de hamster producidos en conejo. De todos modos las diferencias encontradas en estos estudios podrían deberse a la diferente especificidad de los antisueros utilizados en cada caso.

Si el anti-DE no disminuye la capacidad fertilizante de los espermatozoides a través de un efecto inespecífico, es probable que lo haga a través del enmascaramiento de un receptor o ligando para el ovocito, presente en la superficie de los espermatozoides. Esta suposición estaría apoyada por los estudios inmunohistoquímicos (PAP) e-



fectuados sobre la población de espermatozoides provenientes de túbulos tratados con anti-DE o SCN. Los resultados indicaron la presencia de marcación sobre la cabeza de aquellos espermatozoides recuperados de túbulo expuestos o la acción del anti-DE, obteniéndose una reacción totalmente negativa para los espermatozoides del túbulo control (SCN). Cabe aclarar que la proporción de espermatozoides marcados con PAP no parecería corresponderse con la disminución significativa del porcentaje de fertilización, lo cual podría deberse a que la capacidad fertilizante de los espermatozoides sea afectada aún por cantidades de anticuerpo no detectables por el análisis inmunohistoquímico.

El hecho de que el anti-DE agregado al medio de cultivo inhiba la capacidad fertilizante de los espermatozoides a través de una interacción directa con los mismos, estaría apoyada por una serie de experimentos recientemente realizados en nuestro laboratorio que demuestran que el porcentaje de fertilización obtenido al inseminar invivo una suspensión de espermatozoides de cola distal conteniendo anti-DE, es significativamente menor del que se obtiene al inseminar una población de espermatozoides conteniendo SCN (13% vs 35% respectivamente). Estos resultados son similares a los obtenidos por Moore (330) quien demuestra que los anticuerpos específicos dirigidos contra

3 glicoproteínas de la superficie de los espermatozoides de conejo ( $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$ ) y contra una proteína de la superficie de espermatozoide de hamster ( $H_1$ ), son capaces de reducir en forma significativa la capacidad fertilizante de los espermatozoides epididimarios de ambas especies. Es probable que estos anticuerpos hayan inhibido la capacidad fertilizante impidiendo la penetración de la zona pelúcida, ya que la mayoría de los ovocitos no fertilizados carecían de espermatozoides en el espacio perivitelino. La inhibición del pasaje de espermatozoides a través de las distintas envolturas del ovocito, también ha sido descrita por Tzartos (329) mediante el empleo de anticuerpos anti espermatozoides de hamster.

En conjunto, estos resultados sugerirían que los anticuerpos contra antígenos de espermatozoides actuarían en distintas etapas de la prefertilización y fertilización, bloqueando alguna estructura receptora encargada de reconocer al ovocito. En el caso particular de la rata, la inhibición de la capacidad fertilizante que produce el anti-DE, sumado a la localización de DE en el sitio por el cual el espermatozoide se fusiona con el ovocito, nos permiten postular la participación de estas proteínas en la formación y/o activación de dicho receptor. En publicaciones simultáneas, Ahuja (1982) (331) y Huang (1982) (332) han demostrado que la fucosa y su polímero la fucoidina, son potentes inhibi

bidores de la unión de espermatozoides a la zona pelúcida y de la fertilización en el hamster, el cobayo y el hombre. Este efecto fue compartido por otros azúcares simples, principalmente galactosa y N-acetil- D glucosamina. Por otra parte las enzimas que rompen estos azúcares (fucoidasa, galactosidasa y N-acetil hexosaminidasa), previenen la interacción entre gametas cuando se les permite actuar sobre los espermatozoides, siendo totalmente inactivas sobre los ovocitos. Estos datos dan un nuevo interés al elevado contenido de N-acetil-D glucosamina que posee la glicoproteína DE (274), pudiendo ser un factor clave dentro del mecanismo por el cual los espermatozoides aumentan su capacidad de reconocimiento durante la maduración.

## CONCLUSIONES

El objetivo del presente trabajo fue y continúa siendo el de contribuir al estudio de los factores y mecanismos involucrados en el proceso de maduración de los espermatozoides.

La primera parte de nuestros estudios demuestra que el epidídimo del hamster es capaz de producir una serie de glicoproteínas específicas, de bajo peso molecular, ( $PE_{1-6}$ ), cuya síntesis resulta ser claramente andrógeno-dependiente. La presencia de algunas de estas proteínas en el fluido epididimario, como así también la detección de 2 de ellas en la superficie de los espermatozoides de la cola distal del epidídimo, pero no en la de espermatozoides provenientes del testículo o de los segmentos epididimarios proximales, sugiere que estas proteínas, una vez secretadas al lumen, se asociarían a los espermatozoides a medida que los mismos transitan por el epidídimo.

En la segunda parte del trabajo hemos presentado numerosas evidencias en favor de la participación de las proteínas epididimarias en el proceso de maduración. A nuestro entender, estas proteínas sintetizadas por el tejido en respuesta a los andrógenos y capaces de interactuar con los espermatozoides, participarían en la for-

mación y/o activación de una estructura receptora necesaria para el reconocimiento y unión de los espermatozoides a la zona pelúcida de los ovocitos. Puesto que estas proteínas aumentan la capacidad de reconocimiento de los espermatozoides del cuerpo proximal, pero no logran modificar su capacidad fertilizante, es probable que la adquisición de dicha capacidad requiera de algún factor adicional presente en regiones más distales del epidídimo.

Los resultados obtenidos en la rata, si bien menos concluyentes, permiten inferir para las proteínas DE un papel semejante al de las PE<sub>1-6</sub> descritas en el hamster, sugiriendo de este modo que la formación de un sitio de reconocimiento en el espermatozoide, mediado por proteínas epididimarias andrógeno-dependientes, podría ser en realidad un mecanismo común a diferentes especies de mamíferos.

Las conclusiones alcanzadas en cuanto al proceso de maduración en el epidídimo del hamster y la rata, como así también la experiencia adquirida a través del empleo de estos animales, nos alentarón a extender nuestros estudios hacia el hombre. Es así que un grupo de investigadores de nuestro laboratorio ha establecido la existencia de un proceso de maduración de los espermatozoides humanos que culmina con la adquisición de su capacidad fertilizante (79). Si bien aún no se conocen los factores o mecanismos que in -

tervienen en dicho proceso, consideramos de interés mencionar una serie de resultados recientemente obtenidos en nuestro laboratorio, que demuestran que el epidídimo humano en cultivo es capaz de sintetizar un gran número de proteínas secretorias andrógeno-dependientes, al menos dos de las cuales parecerían asociarse a la superficie de los espermatozoides (333).

Tal como puede observarse, los datos obtenidos hasta el momento en el hombre presentan una gran similitud con aquellos descritos previamente en el hamster y la rata, lo cual justifica la continuación de nuestras investigaciones en animales de laboratorio y valida su empleo como modelo biológico para el estudio del proceso de maduración de los espermatozoides humanos. De este modo creemos acercarnos un poco más al conocimiento de la fisiología del epidídimo humano y con ello a la comprensión de algunos de los muchos problemas de infertilidad existentes en el hombre y cuya etiopatogenia aún se desconoce.

J. Blazquez

12/11/68

BIBLIOGRAFIA

1. Fawcett, D.W. (1970). Comparative view of sperm ultrastructure. Biol. Reprod. Suppl. 2<sup>o</sup> : 90-127.
2. Phillips, D.M. (1974). Spermiogenesis. New York: Acad. Press.
3. Mc Rorie, R.A. and Williams, W.L. (1974). Biochemistry of mammalian fertilization. Ann. Rev. Biochem. 43 : 777-803.
4. Johnson, M.H. (1975). The macromolecular organization of membranes and its bearing on events leading up to fertilization. J. Reprod. Fert. 44 : 167-184.
5. Benoit, J. (1926). Recherches anatomiques, cytologiques et histophysiologiques sur les voies excrétices du testicule, chez les mammifères. Archs. Anat. Hist. Embryol. 5 : 173-412.
6. Flickinger, C.J.; Howards, S.S. and English, H.F. (1978). Ultrastructural differences in efferent ducts and several regions of the epididymis of the hamster. Am J. Anat. 152 : 557-586.
7. Glover, T.D.; Nicander, L. (1971). Some aspects of structure and function in mammalian epididymis. J. Reprod. Fert., Suppl. 13 : 39-50
8. Hamilton, D.W. (1975). Structure and function of the epithelium lining the ductuli efferentes, ductus epididymis, and ductus deferens in the rat; in Handbook of physiology, sect 7, vol. 5, pp 259-301 (American Physiological Society, Washington).
9. Dadoune, J.P. (1981). Structural and Metabolic findings on epididymis cells. Prog. Reprod. Biol., vol. 8 pp. 34-47 (Karger, Basel).
10. Hoffer, A.P.; Greenberg, J. (1978). The structure of the epididymis, efferent ductules and ductus deferens of the guinea-pig. A light microscope study. Anat. Rec. 190 : 659-678.

11. Reid, B.L.; Cleland, K.W. (1957). The structure and function of the epididymis. I. The histology of the rat epididymis. *Aust. J. Zool.* 5 : 223-246.
12. Nicander, L. (1958). Studies on the regional histology and cytochemistry of the ductus epididymis in stallion, rams and bulls. *Acta morph. neerl. -Scand.* 1 : 337-362.
13. Nicander, L. (1957). On the regional histology and cytochemistry of the ductus epididymis in rabbits. *Acta Morphol. neerl.-Scand.* 1 : 99-118.
14. Holstein, A.F. (1969). Morphologische Studien am Nebenhoden des Menschen. *Zwangl. Abh. Geb. norm. path. Anat.* 20 : 1-91.
15. Wong, P.Y.D.; Au, C.L.; Ngai, H.K. (1979). Some characteristics of salt and water transport in the rat epididymis. In : *The spermatozoon*. Ed. by D.N. Fawcett and M. Beadford. Urban and sch warzenberg, Baltimore, pp. 57.
16. Fain-Maurel, M.A.; Dadoune, J.P. and Alfonsi, M.F. (1981). High resolution autoradiographic study of newly formed proteins in different segments of the epididymis after incorporation of tritiated aminoacids. *Archs. Andrology* 6 : 249.
17. Risley, P.L. (1970). Fluorescence of holocrine epithelial cells of the epididymis *Biol. Reprod.* 3 : 67-75.
18. Crabo, B. (1965). Studies on the composition of epididymis content in bulls and boars. *Acta Vet. Scand.* 6, Suppl. 5 : 1-94.
19. Dawson, R.M.C.; Mann, T.; White, I.G. (1957). Glyceryl - phosphoryl choline and phosphoryl choline in semen, and their relation to choline. *Biochem. J.* 65 : 627-634.
20. Scott, T.W.; Wales, R.G.; Wallace, J.C.; White, I.G. (1963). Composition of ram epididymal and testicular fluid and biosynthesis of glycerilphosphorylcholine by the rabbit epididymis. *J. Reprod. Fertility* 6 : 49-59.



21. Mann, T. (1964). *Biochemistry of semen and of the Male Reproductive Tract* (London: met huen). p 493.
22. Neutra, M.; Leblond, C.P. (1966). Radioautografic comparision of the uptake of galactose-<sup>3</sup>H and glucose-<sup>3</sup>H in the Golgi region of various cells secreting glycoproteins or mucopolysacharides. *J. Cell Biol.* 30 : 137-150.
23. Gustafsson, B. (1966). Luminal contents of the bovine epididymis under conditions of reduced spermatogenesis, luminal blockage and certain sperm abnormalities. *Acta Vet. Scand. Suppl.* 17 : 1-80.
24. Bose, A.R.; Kar, A.B.; Das Gupta, P.R. (1966). Sialic acid in the genital organs of the male rat. *Current Sci.. India* 35 : 336-337.
25. Fournier, S. (1966). Distribution of sialic acid in the genital system of adult normal and castrated Wistar rats *Compt. Rend. Soc. Biol.* 160 : 1087-1090.
26. Rajalakshmi, M. and Prasad, M.R.N. (1968). Changes in the sialic acid content of the accesory glands of the male rat. *J. Endocrinol.* 41 : 471-476.
27. Press, E.M.; Porter, R.R. (1966). Immunoglobulins. In : *Glycoproteins*, edited by A. Gottschalk. Amsterdam : Elsevier, pp. 395-412.
28. Pearson, O.J.; Tubbs, P.K. (1967). Carnitine and derivates in rat tissues. *Biochem. J.* 105 : 953-963.
29. White, I.G.; Hudson, B. (1968). The Testosterone and Dehidro-epiandrosterone concentrations in fluids of the mammalian male reproductive tract. *J. Endocrinol.* 41 : 291-292.
30. Gloyna, R.E.; Wilson, H.D. (1969). A comparative study of the conversion of testosterone to  $17\beta$ -hidroxy  $5\alpha$  androstan-3-one (dihidrotestosterone) by prostate and epididymis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 29 : 970.

31. Mc Gadey, J.; Baillie, A.H.; Ferguson, M.M. (1966). Histochemical utilization of hidroxysteroids by the hamster epididymis. *Histochimie*. 7 : 211-217.
32. Hamilton, D.W.; Jones, A.L.; Fawcett, D.W. (1968). Sterol biosynthesis from (1-<sup>14</sup>C) acetate in the epididymis and vas deferens of the mouse. *J. Reprod. Fertil. (abstr.)* 18 : 156.
33. Hamilton, D.W. (1971). Steroid function in the mammalian epididymis. *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)* 13 : 89-97.
34. Frankel, A.I.; Eik-Nes, K.B. (1968) Steroidogenesis in vitro of the epididymis of the rabbit. *Rec. Proc. (abst.)* 27 : 624.
35. Cavazos, L.F. (1958). Effects of testosterona propionate on histochemical reaction of epithelium of rat ductus epididymis. *Anat. Rec.* 132 : 209.
36. Gohary, M.; Cavazos, L.F.; Manning, J.P. (1962). Effects of testosterone on histochemical reactions of epithelium of hamster ductus epididymis and seminal vesicle. *Anat. Rec.* 144 : 229.
37. Manely, R.B. (1958). The effect of bilateral gonadectomy on the histology and histochemistry of the surviving epididymis in rats. *Acta Anat.* 32 : 361.
38. Van der Welde, R.; Van der Welde, S.C. (1968). Annulated lamellae in the ductus epididymis of fetal and castrated adult rats. *Anat. Rec.* 161 : 427.
39. Brooks, D.E. (1979). Biochemical enviroment of sperm maturation In : *The spermatozoon*. Ed. by D.N. Fawcett and M. Bedford. Urban and Schwarzenberg, Baltimore, pp. 23.
40. Dawson, R.M.C.; Rowland, I.W. (1958). *Quart. J. Exp. Physiol. Med. Sci.* 44 : 26-34.
41. Prasad, M.R.N.; Rajalakshmi, M.; Gupta, G.; Karkum, T. (1973). Control of epididymal function. *J. Reprod. Fertil. (Suppl)* 18 : 215-222.

42. Fournier, D.A.; Bayard, F.; Boulard, C. (1973). Contribution a l'étude de la maturation du sperma. Etude d'une protéine acide de l'epididyme chez la rat. Depence androgéne relation avec l'acide sialique. C.R. Soc. Biol., Paris, 167 : 1989.
43. Marquis, N.R.; Fritz, I.B. (1965). Effects of testosterone on the distribution of carnitine, acetylcar nitine and carnitine acetyltransferase in tissues of the reproductive system of the male rat. J. Biol. Chem., 240 : 2197-2200.
44. Allen, J.M.; Slater, J.J. (1959). A chemical and histochemical study of acid phosphatase in the epididymis of normal, castrate and hormone replaced castrated mice. Anat. Rec., 130 : 731.
45. Larminat, M. de; Monsalve, A.; Charreau, E.H.; Calandra, R. S.; Blaquier, J.A. (1978). Hormonal regulation of 5 $\alpha$  reductase activity in rat epididymis. J. Endoc., 79 : 157.
46. Moore, C.R. (1928) On the properties of the gonads as controllers of somatic and physical characteristics. X spermatozoon activity and the testis hormone. J. Exptl. Zool. 50 : 455.
47. Dyson, A.L.; Orgebin -Crist, M.C. (1973). Effect of hypophysectomy, castration and androgen replacement upon fertilizing ability of rat epididymal spermatozoa. Endocrinology, 93 : 391.
48. Lubicz-Nawrocki, C.M. (1976). The effect of metabolites of testosterone on the development of the fertilizing ability by spermatozoa in the epididymis of castrated hamsters. J. Exptl. Zool. 197 : 89.
49. Lubicz-Nawrocki; Chang, M.C. (1973). The comparative efficacy of testosterone, progesterone and di hydroepiandrosterone for the maintenance of fertilizing capacity in castrated hamster. Biol. Reprod. 9 : 295.
50. Giorgi, E.P. (1976). Studies on androgen transport into canine prostate in vitro. J. Endocr. 68 : 109.
51. Baulieu, E.E.; Atger, M.; Best-Belpomme, M.; Corvol, P.; Courvalin, J.C.; Mester, J.; Milgrom, E.; Robel, P.; Rochefort, H.; de Catalogne, D. (1975). Steroid Hormone Receptors. Vit. Horm. 33 : 649.

52. Gorski, J.; Gannon, F. (1976). Current models of steroid action as critique. *A Rev. Physiol.* 38 : 425.
53. Eik-Nes, K.B. (1975). Biosynthesis and secretion of testicular steroids. In : *Handbook of Physiology*, ed. by D.W. Hamilton and R.O. Greep, American Physiological Society, Washington D.C., Vol. V, Sec. 7 : 95.
54. Setchell, B.P. (1978). *The Mammalian Testis*. Cornell University Press, Ithaca, New York. pp. 181.
55. De Larminat, M.A.; Blaquier, J.A. (1978). Androgen concentration and partial characterization of 5 reductase in the epididymis of the Rhesus Monkey. *Steroids.* 3 : 129.
56. Harris, M.E.; Barke, A. (1975). Maintenance of rete testis fluid testosterone and dihydrotestosterone levels by pregnenolone and other C<sub>21</sub> steroids in hypophysectomized rats. *Endocrinology* 96 : 1396.
57. Aafges, J.H.; Vreeburg, J.Th. M. (1972). Distribution of 5 dihydrotestosterone in the epididymis of bull and boar, and its concentration in rat epididymis after ligation of efferent testicular ducts, castration and unilateral gonadectomy. *J. Endocr.* 53 : 85.
58. Larminat, M. de; Cuasnicú, P.; Blaquier, J.A. (1980). The in vitro metabolism of androgens in rat epididymis during sexual development. *J. Steroid Biochem.* 13 : 1207.
59. Liao, S.; Liang, T.; Fang, S.; Castañeda, E.; Shao, T.C. (1973). Steroid structure in androgenic activity specificities involved in the receptor binding and nuclear retention of various androgens. *J. Biol. Chem.* 248 : 6154.
60. Blaquier, J.A. (1971). Selective uptake and metabolism of androgens by rat epididymis. The presence of a cytoplasmic receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 45 : 1076.

61. Hansson, V.; Djöseland, O.; Reusch, E.; Attramadal, A. Torgersen, O. (1973). Intracellular receptors for  $5\alpha$  dihydrotestosterone in the epididymis of adult rats. Comparison with the androgenic receptor in the ventral prostate and androgen binding protein (ABP) in the testicular and epididymal fluids. *Steroids*. 22 : 19.
62. Ritzén, E.M.; Nayfeh, S.N.; French, F.G.; Dobbins, M.C. (1971) Demonstration of androgen-binding components in rat epididymal cytosol and comparison with binding components in prostate and other tissues. *Endocrinology* 89 : 143.
63. Tindall, D.J.; Hansson, V.; Mc Lean, W.S.; Ritzén, E.M.; Nayfeh, S.J.; French, F.S. (1975). Androgen binding protein in rat epididymis : properties of a cytoplasmic receptor for androgens similar to the receptor in rat prostate and different from androgen binding protein (ABP). *Moll. Cell Endocr.* 3 : 83.
64. Danzo, B.J.; Orgebin-Crist, M.C.; Toft, D.O. (1975). Characterization of a cytoplasmic receptor for  $5\alpha$  dihydrotestosterone in the caput epididymis of intact rabbits. *Endocrinology*. 92 : 310.
65. Blaquier, J.A.; Calandra, R.S. (1973). Intracellular receptor for androgens in rat epididymis. *Endocrinology*. 93 : 51.
66. Tindall, D.J.; French, F.S.; Nayfeh, S.N. (1972). Androgen uptake and binding in rat epididymal nuclei, in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 49 : 1391-1397.
67. Blaquier, J. (1973). An in vitro action of androgens on protein synthesis by epididymal tubules maintained in organ culture. *Biochem-Biophys. Res. Comm.* 52 : 1177.
68. Muldoon, T.G. (1980). Regulation of steroid hormone receptor activity. *Endocrine Rev.* 1 : 339.
69. Blaquier, J.A.; Cameo, M.S.; Burgos, M.H. (1972). The role of androgens in the maturation of epididymal spermatozoa in the guinea-pig. *Endocrinology*. 90 : 839.

70. Burgos, M.H.; Blaquier, J.A.; Cameo, M.S.; Gutiérrez, L. (1972). Morphological maturation of spermatozoa in the epididymis in : *Biology of Reproduction. Basic and Clinical Studies*, edited by J.T. Velardo y B.A. Kaspro. 37 : 367.
71. Amann, R.P.; Hammeistedt, R.H. (1976). Binding of Steroids by intact bovine sperm. *Biol. Reprod.* 15 : 670-677.
72. Orgebin-Crist, M.C.; Davies, J. (1974). Functional and morphological effects of hypophysectomy and androgen replacement in the rabbit epididymis. *Cell Tiss. Res.* 148 : 188-201.
73. Young, W.C. (1931). A study of the function of the epididymis III Functional changes undergone by spermatozoa during their passage through the epididymis and vas deferens in the guinea-pig. *J. exp. Biol.* 8 : 151.
74. Bedford, J.M. (1966) Development of the fertilizing ability of spermatozoa in the epididymis of the rabbit. *J. Exp. Zool.* 163 : 319-329.
75. Orgebin-Crist, M.C. Sperm maturation in rabbit epididymis *Nature* 216 : 816-818.
76. Blandau, R.J.; Rumery, R.E. (1964). The relationship of swimming movements of epididymal spermatozoa to their fertilizing capacity. *Fertil. Steril.* 15 : 571-579.
77. Horan, A.H.; Bedford, J.N. (1972). Development of fertilizing ability of spermatozoa in the epididymis and the syrian hamster.
78. Fournier-Delpech, S.; Danzo, B.J.; Orgebin-Crist, M.C. (1977). Extraction of Concanavalin A affinity material from rat testicular and epididymal spermatozoa. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 17 : 207.
79. Hinrichsen, M.J.; Blaquier, J.A. (1980). Evidence supporting the existence of sperm maturation in the human epididymis. *J. Reprod. Fertil.* 60 : 291.

80. Orgebin-Crist, M.C. (1968). Maturation of spermatozoa in the rabbit epididymis : delayed fertilization in does inseminated with epididymal spermatozoa. *J. Reprod. Fertility*. 16 : 29-33.
81. Orgebin-Crist, M.C. (1969). Studies on the function of the epididymis *Biol. Reprod. Suppl.* 1 : 155-175.
82. Orgebin-Crist, M.C.; Jahad, N. (1977). Delayed cleavage of rabbit ova after fertilization by young epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod.* 16 : 358.
83. Brackett, D.S.; Hall, J.L.; Oh, Y.K. (1978). In vitro fertilizing ability of testicular epididymal and ejaculated rabbit spermatozoa. *Fert. Steril.* 29 : 571-582.
84. Fournier-Delpech, S.; Colas, G.; Courot, M.; Ortavant, R. and Brice, G. (1979). Sperm maturation in the ram : Motility, fertilizing ability, and embryonic survival. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 19 : 597-605.
85. Cummins, J.M. (1976). Effects of epididymal occlusion on sperm maturation in the hamster. *J. Expt. Zool.* 197 : 187-190.
86. Bedford, J.M. (1975). Maturation, transport and fate of spermatozoa in the epididymis in : *Handbook of Physiology, section on endocrinology* pp. 303-317, ed. by E. Astwood, and R.O. Greep. American Physiology Society, Washington, D.C.
87. Hammar, J,A. (1897). *Arch. Anat. Physiol. Suppl.* Bd. XIII, 1-42.
88. Tournade, A. (1913). Difference de Motilite des Spermatozoides Preveles dans les Divers Segments de l'Epididyme. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*. 74 : 738-739.
89. Calvin, H.; Bedford, J.M. (1971). Formation of disulfide bonds, in the nucleus and accesory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 13: 65-75.

90. Bedford, J.M.; Calvin, H.; Cooper, G.W. (1973). The maturation of spermatozoa in the human epididymis. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 18 : 199-213.
91. Tongkao, D.; Chubavatnatol, M. (1979). Phosphoylation of microtubules of rat spermatozoa during epididymal maturation in : *The spermatozoon* ed. by D.W. Fawcett and M. Bedford. Urban and Schwarzenberg, Baltimore, pp. 129.
92. Hoskins, D.D.; Stephens, D.T.; Hall, M.L. (1974). Cyclic Adenosine 3' : 5' - Monophosphate and Protein Kinase Levels in Developing Bovine spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 37 : 131-133,
93. Hoskins, D.D.; Hall, M.L.; Munsterman, D. (1975). Induction of motility in Inmature Bovine spermatozoa by Cyclic AMP. Phosphodiesterase inhibitors and seminal plasma. *Biol. Reprod.* 13 : 168-176.
94. Frenkel, G.; Peterson, R.N.; Freund, M. (1973). The role of adenine nucleotides and the effect of caffeine and dibutyryl cyclic AMP on the metabolism of guinea-pig spermatozoa. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 144 : 420-425.
95. Wyler, R.; Howards, S.S. (1977). Micropuncture studies of the motility of retetestis and epididymal spermatozoa. *Fertil-Steril* 28 : 108-112.
96. Lindhomer, C. (1974). The importance of seminal plasma for human sperm motility. *Biol. Reprod.* 10 : 533-542.
97. Acott, T.S.; Hoskins, D.D. (1978). Bovine sperm foward motility protein : Partial purification and characterization. *J. Biol. Chem.* 253 : 6744-6750.
98. Young, W.C. (1929). A study of the function of the epididymis. II The importance of an ageing process in sperm for the length of the period during which fertilizing capacity is retained by sperm isolated in the epididymis of the guinea-pig. *J. Morphol.* 48 : 475-491.



99. Glover, T.D. (1962). The response of rabbit spermatozoa to artificial cryptorchidism and ligation of the epididymis. *J. Endocrinol.* 23 : 317-328.
100. Gaddum, P.; Glover, T. (1965). Some reactions of rabbit spermatozoa to ligation of the epididymis. *J. Reprod. Fertil* 9 : 119-130.
101. Orgebin-Crist, M.C. (1973). Maturation of spermatozoa in the rabbit epididymis : Effect of castration and testosterone replacement. *J. Exp. Zool.* 188 : 301-309.
102. Mooney, J.K.; Horan, A.H.; Latlimer, J.K. (1972). Motility of spermatozoa in the human epididymis. *J. Urol.* 108 : 443-445.
103. Burgos, M.H.; Tovar, E.S. (1974). Sperm motility in the rat epididymis. *Fertil. Steril.* 25 : 291-298.
104. Voglmayr, J.K.; Scott, T.W.; Setchell, B.P.; Waites, G.M.H. (1967). Metabolism of testicular spermatozoa and characteristics of testicular fluid collected from conscious rams. *J. Reprod. Fertility.* 14 : 87-99.
105. Voglmayr, J.K. (1975). Metabolic changes in spermatozoa during epididymal transit. In *Handbook of physiology, sect. 7 Endocrinology*, Ed. D.W. Hamilton and R.O. Greep, pp. 437-451. Washington D.C. American Physiological Society.
106. Dacheux, J.L.; O'Shea, T.; Paquignon, M. (1979). Effects of osmolality, bicarbonate and buffer on the metabolism and motility of testicular, epididymal and ejaculated spermatozoa of boars. *J. Reprod. Fertil.* 55 : 287.
107. Murdoch, R.N.; White, I.G. (1968). Metabolic studies of testicular epididymal, and ejaculated spermatozoa of the ram. *Australian J. Biol. Sci.* 21 : 111-121.
108. Voglmayr, J.K.; Waites, G.M.H.; Setchell, B.P. (1966). Studies on spermatozoa and fluid collected directly from the testis of the conscious ram. *Nature* 210 : 861-863.

109. Scott, T.W.; Voglmayr, J.K.; Setchell, B.P. (1967) Lipid composition and metabolism in testicular and ejaculated ram spermatozoa. *Biochem. J.* 102 : 456-461.
110. Abraham, K.A.; Bhargava, P.M. (1963). Nucleic acid metabolism of mammalian spermatozoa. *Biochem. J.* 86 : 298-308.
111. Bragg, P.W.; Handel, M.A. (1979). Protein synthesis in mouse spermatozoa. *Biol. Reprod.* 20 : 333-337.
112. Tuck, R.R.; Setchell, B.P.; Waites, G.M.H.; Young, J.A. (1970). The composition of fluid collected by micropuncture and characterization from the seminiferous tubules and rete testis of rats. *Pfluegers Arch.* 318 : 225-243.
113. Levine, J.; Marsh, D.J. (1971). Micropuncture studies of the electrochemical aspect of fluid and electrolyte transport in individual seminiferous tubules, the epididymis and the vas deferens in rats. *J. Physiol. London* 213: 557-570.
114. Howards, S.S.; Lechene, C.; Viglisky, R.C. (1979). In the spermatozoon Ed. D.W. Fawcett and J.M. Bedford Urban and Schwarzenberg, Baltimore, Munich 35-41.
115. Johnson, A.L.; Howards, S.S. (1977) Hyperosmolality, in intraluminal fluids from hamster testis and epididymis : A micropuncture study. *Science* 195 : 492-493.
116. Jessee, S.; Howards, S.S. (1976). A survey of spermatozoa, sodium and potassium concentrations in the hamster epididymis. *Biol. Reprod.* 15 : 626-631.
117. Turner, T.T.; Hartmann, P.K.; Howards, S.S. (1977). In vivo sodium potassium and sperm concentrations in the rat epididymis *Fertil Steril* 28 : 191-194.
118. Voglmayr, J.K.; White, I.G. (1979). Effects of rete testis and epididymal fluid on the metabolism and motility of testicular and post-testicular spermatozoa of the ram. *Biol. Reprod.* 20 : 288-294.

119. Casillas, E.R. (1972). The distribution of carnitine in male reproductive tissues and its effect on palmitate oxidation by spermatozoa particles. *Biochem. Biophys. Acta* 280 : 545-551.
120. Hutson, S.M.; Van Dop, C.; Lardy, H.A. (1977). Metabolism of pyruvate and carnitine esters in bovine epididymal sperm mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 181 : 345-352.
121. Hamilton, D.W.; Olson, G.E. (1976). Effects of carnitine on oxygen uptake and utilization of ( $U^{14}C$ ) palmitate by ejaculated bull spermatozoa *J. Reprod. Fert.* 46 : 195-202.
122. Ganjam, V.K.; Amann, R.P. (1976). Steroids in fluids and sperm entering and leaving bovine epididymal tissue and accessory sex gland secretions. *Endocrinology.* 99 : 1618.
123. Murdoch, R.N.; White, I.G.; Seamark, R.F. (1970). Oxidative and glycolytic activity of ejaculated ram spermatozoa in the presence of steroid hormones. *Acta Endocrinol.* 64 : 557.
124. Voglmayr, J.K. (1971). The effect of testosterone and related steroids on the oxidative and glycolytic activity and on lipid synthesis of testicular and ejaculated bull spermatozoa. *Acta Endocrinol. (Kbh).* 68 : 793-804.
125. Voglmayr, J.K.; Amann, R.P. (1973). Glucose metabolism and lipid synthesis of cauda epididymal and ejaculated bull spermatozoa in the presence of selected androgens. *Acta Endocrinol. (Kbh)* 73 : 196-208.
126. Tamblyn, T.M. (1980) Identification of actin in boar spermatozoa. *Biol. Reprod.* 22 : 727-734.
127. Bedford, J.M. (1963). Morphological changes in rabbit spermatozoa during passage through the epididymis *J. Reprod. Fertil.* 5 : 169-177.
128. Bedford, J.M.; Nicander, L. (1971). Ultrastructural changes in the acrosome and sperm membranes during maturation of spermatozoa in the testis and epididymis of the rabbit and monkey. *J. Anat.* 108 : 527-544.

129. Jones, R.C. (1971). Changes in ultrastructure of mammalian spermatozoa after leaving the testes. *J. Reprod. Fertility Suppl.* pp. 13.
130. Fawcett, D.W.; Hollenberg, R.D. (1963). Changes in the acrosome of guinea pig spermatozoa during passage through the epididymis *Z. Zellforsch.* 60 : 276-292.
131. Fawcett, D.W.; Phillips, D.H. (1969). Observations on the release of spermatozoa and on changes in the head during passage through the epididymis. *J. Reprod. Fertility Suppl.* 6 : 405-418.
132. Temple-Smith, P.D.; Bedford, J.M. (1976). The feature of sperm maturation in the epididymis of a marsupial, the Brush-Tailed Possum *Trichosurus vulpecula.*, *Am. J. Anat.* 147 : 471-500.
133. Fléchon, J.E.; Dubois, M.P. (1975). Immunocytochemical localization of hyaluronidase in the sperm acrosome of sperm mammals. 3 rd Int. Symp. Immunol. Reprod. C.R. Acad. Sci., Ser. D. 280 : 877-880.
134. Gaddum, P.; Blandau, R.J. (1971). Comparative studies on the proteolytic activity of sperm acrosomes during development maturation and capacitation. *Anat. Record.* 169 : 321.
135. Olson, G.; Hamilton, D.W. (1976). Morphological changes in the midpiece of wooly opossum spermatozoa during epididymal transit. *Anat. Rec.* 186 : 387-404.
136. Friend, D.S.; Fawcett, D.W. (1974). Membrane differentiations in freeze-fractured mammalian sperm. *J. Cell. Biol.* 63 : 641-664.
137. Fawcett, D.W. (1975). The mammalian spermatozoon. *Dev. Biol.* 44 : 394-436.
138. Suzuki, F.; Nagano, T. (1980). Epididymal maturation of rat spermatozoa studied by thin sectioning and freeze-fracture. *Biol. Reprod.* 22 : 1219-1231.

139. Olson, G.E.; Sammons, D.W. (1980). Structural chemistry of outer dense fibers of rat sperm. *Biol. Reprod.* 22 : 319-332.
140. Bedford, J.M. (1963). Changes in the electrophoretic properties of rabbit spermatozoa during passage through the epididymis. *Nature.* 200 : 1178-1180.
141. Cooper, G.W.; Bedford, J.M. (1971). Acquisition of surface change by the plasma membrane of mammalian spermatozoa during epididymal maturation. *Anat. Record.* 169 : 300.
142. Yanagimachi, R.; Noda, Y.D.; Fujimoto, M.; Nicolson, G.L. (1972). The distribution of negative surface charges on mammalian spermatozoa. *Am. J. Anat.* 135 : 497-520.
143. Fléchon, J.E.; Morstin, J. (1975). Localisation des glycoprotéines et des charges négatives et positives dans le revêtement de surface des spermatozoïdes éjaculés de Lapin et de Taureau. *Ann Histochim* 20 : 291-300.
144. Courtens, J.L.; Fournier-Delpech, S. (1979). Modifications in the plasma membranes of epididymal ram spermatozoa during maturation and incubation in utero. *J. Ultrastruct. Res.* 68 : 136-148.
145. Johnson, W.C.; Hunter, A.G. (1970). Immunofluorescent changes associated with maturation of rabbit sperm (abstract). *Proc. Soc. Study Reprod.* 3 : 81.
146. Johnson, W.C.; Hunter, A.G. (1972). Immunofluorescent evaluation of the male rabbit reproductive tract for sites of secretion and absorption of seminal antigens. *Biol. Reprod.* 6 : 13-22.
147. Nicolson, G.L.; Usui, N.; Yanagimachi, R.; Yanagimachi, H.; Smith, J.R. (1977). Lectin binding sites on the plasma membranes of rabbit spermatozoa changes in surface receptors during epididymal maturation and after ejaculation. *J. Cell. Biol.* 74 : 950.
148. Gordon, M.; Dandekar, P.V.; Bartoszewicz, W. (1975). The surface coat of epididymal, ejaculated and capacitated sperm. *J. Ultrastruct Res.* 50 : 199-207.

149. Cooper, G.W.; Bedford, J.M. (1976). Asymmetry of spermiation and sperm surface charge patterns over the Giant acrosome in the musk shrew *suncus murinus*. *J. Cell. Biol.* 69 : 415-428.
150. Steck, T.L. ; Dawson, G. (1974). Topographical distribution of complexes carbohydrates in the erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.* 249 : 2135-2142.
151. Olson, G.E.; Hamilton, D.W.(1978). Characterization of the surface glycoproteins of rat spermatozoa. *Biol. Reprod.* 19 : 26.
152. Olson, G.E.; Danzo, B.J. (1981). Surface changes in rat spermatozoa during epididymal transit. *Biol. Reprod.* 24:431.
153. Nicolson, G.L.; Yanagimachi, R. (1979). Cell surface changes associated with epididymal maturation of mammalian spermatozoa. In : *The spermatozoon*. Ed. by D.W. Fawcett and J. Bedford. Urban and Schwarzenberg, Baltimore. pp. 187.
154. Voglmayr, J.K.; Fairbanks, G.; Jackowitz, M.A.; Colella, J. R. (1980). Post-testicular developmental changes in the ram sperm cell surface and their relationship to luminal fluid proteins of the reproductive tract. *Biol. Reprod.* 22 : 655-667.
155. Amman, R.P.; Killian, G.Y.; Benton, A. (1973). Differences in the electrophoretic characteristics of bovine rete testis-fluid and plasma from the cauda epididymis. *J. Reprod. Fertil.* 35 : 321.
156. Huang, H.F.S.; Johnson, A.D. (1975). Comparative study of protein pattern of epididymal plasma of mouse, rat, rabbit and sheep. *Comp. Biochem. Physiol.* 51 : B: 337-341.
157. Kosrimies, A.I.; Kormano, M. (1975). Proteins in fluids from different segments of the rat epididymis. *J. Reprod. Fertil.* 43 : 345.
158. Turner, T.E.; Plessums, J.L. *Biol. Reprod.* (en prensa).

159. Brooks, D.E.; Higgins, S. J.(1980). Characterization and androgen dependence of proteins associated with luminal fluid and spermatozoa in the rat epididymis. *J. Reprod. Fertil.* 59 : 363-375.
160. Fournier, S. (1968). Electrophorese des protéines du tractus genital du rat. Présence dans le sperme epididymaire d'une glycoprotéine migrant vers l'anode a pH 8.45. *C.R. Séanc. Soc. Biol.* 162 : 568-571.
161. Cameo, M.S.; Blaquier, J.A. (1976). Androgen controlled specific proteins in rat epididymis. *J. Endocr.* 69 : 47.
162. Barker, L.D.S.; Amann, R.P. (1971). Epididymal physiology II Immuno fluorescent analysis of epithelial secretion and absorption and of bovine sperm maturation. *J. Reprod. Fert.* 26 : 319-332.
163. Vendrely, C.; Durliat, M. (1968). Etude autoradiographique de l'influence de l'hormone male sur l'incorporation de leucine dans le tractus génital de la souris blanche. *Arch. Anat. (Strasbourg)*. 51 : 735-740.
164. Kopecny, V. (1971). Epididymal luminal contents labelling after  $^{14}\text{C}$  or  $^3\text{H}$ -lysine administration in the mouse. *Acta Histochem.* 40 : 116-122.
165. Bennett, G.; Leblond, C.P.; Haddad, A. (1974). Migration of glycoproteins from the golgi apparatus to the surface of various cell types as shown by radioautography after labelled fucose injection into rats. *J. Cell. Biol.* 60 : 258-271.
166. Kanka, J.; Kopecny, V. (1977). An autoradiographic study of macromolecular synthesis in the epithelium of the ductus epididymis in the mouse. I. DNA, RNA and protein. *Biol. Reprod.* 16: 421-427.
167. Kopecny, V.; Pech, V. (1977). An autoradiographic study of macromolecular synthesis in the epithelium of the ductus epididymis in the mouse, *Histochemistry* 50 : 229-238.
168. Flickinger, C.J. (1979). Synthesis, transport and secretion of protein in the initial segment of the mouse epididymis as studied by electron microscope radioautography. *Biol. Reprod.* 20 : 1015-1030.

169. Orgebin-Crist, M.C.; Menezo, Y. (1980). A continuous flow method for organ culture of rabbit epididymis : morphology , aminoacid utilization, glucose uptake, RNA and protein synthesis J. Andrology (in press).
170. Lea, O.A.; Petrusz, P.; French, F.S. (1978). Purification and localization of acidic epididymal glycoprotein (AEG) : a sperm coating protein secreted by the rat epididymis - Int. J. Androl. Suppl. 2 : 592-605.
171. Garberi, J.C.; Kohane, A.C.; Cameo, M.S.; Blaquier, J.A. (1979). Isolation and characterization of specific rat epididymal proteins. Mol. Cell. Endocr. 13 : 73-82.
172. Moore, H.D.M. (1980). Localization of specific glycoproteins secreted by the rabbit and hamster epididymis. Biol. Reprod. 22 : 705-718.
173. Vierula, M.; Rajaniemi, N. (1980). Radioiodination of surface proteins of bull spermatozoa and their characterization by dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Reprod. Fert. 58 : 483-489.
174. Johnson, W.L.; Hunter, A.G. (1972). Seminal Antigens ;their alteration in the genital tract of femal rabbit and during partial in vitro capacitation with  $\beta$  -amylase and  $\beta$  -glucloromidase- Biol. Reprod. 7 : 332-340.
175. Hunter, A.G.; Normes, H.O. (1969). Characterization and isolation of a sperm coating antigen from rabbit seminal plasma with a capacity to block fertilization. J. Reprod. Fertil. 20 : 419-427.
176. Kohane, A.C.; Cameo, M.S.; Piñeiro, L.; Garberi, J.;Blaquier, J.A. (1980). Distribution and site of production of specific proteins in the rat epididymis. Biol. Reprod. 23 : 181-187.
177. Chang, M.C. (1951). The fertilizing capacity of spermatozoa deposited into fallopian tubes. Nature (London) 168 : 697-698.
178. Austin, C.R. (1951). Observations on the penetration of sperm into the mammalian egg. Austral. J. Sci. Res. (B) 4 : 581-592.



179. Austin, C.R. (1952). The capacitation of mammalian sperm. *Nature (London)*. 170 : 326.
180. Yanagimachi, R. (1969 a) In vitro capacitation of hamster spermatozoa by follicular fluid. *J. Reprod. Fert.* 18 : 275-286.
181. Yanagimachi, R. (1969 b) In vitro acrosome reaction and capacitation of golden hamster spermatozoa with bovine follicular fluid and its fractions. *J. Exper. Zool.* 170 : 269-280.
182. Yanagimachi, R. (1970 a) In vitro capacitation of golden hamster spermatozoa by homologous and heterologous blood sera. *Biol. Reprod.* 3 : 147-153.
183. Barros, C.; Garavango, A. (1970). Capacitation of rabbit spermatozoa with blood sera. *J. Reprod. Fert.* 22 : 381-384.
184. Gwatkin, R.B.L.; Hutchison, C.F. (1971). Capacitation of hamster spermatozoa by  $\beta$  glucuronidase. *Nature (London)* 229: 343-344.
185. Barros, C.; Berrios, M.; Herrera, E. (1973). Capacitation in vitro of guinea-pig spermatozoa in saline solution *J. Reprod. Fert.* 34 : 547-549.
186. Bavister, B.D. (1973). Capacitation of golden hamster spermatozoa during incubation in culture medium. *J. Reprod. Fert.* 35: 161-163
187. Oliphant, G.; Brachett, B.G. (1973). Capacitation of mouse spermatozoa in media with elevated ionic strength and reversible decapitation with epididymal extracts. *Fert. Steril.* 24 : 948-955.
188. Austin, C.R. (1975). Membrane fusion events in fertilization. *J. Reprod. Fert.* 44 : 155-156.
189. Aonuma, S.; Mayuma, T.; Suzuki, K.; Noguehi, T.; Iwai, M.; Okabe, M. (1973). Studies in sperm capacitation. I. The relationship between a guinea-pig sperm coating antigen and a sperm capacitation phenomenon. *J. Reprod. Fert.* 35 : 425-432.
190. Schill, W.B.; Heinburger, N.; Schiessler, H.; Stolla, R.; Fritz, H. (1975). Reversible attachment and localization of the acid-stable seminal plasma acrosin-Trypsin inhibitors in spermatozoa as revealed by the indirect immunofluorescence staining technique. *Z. Physiol.Chem.* 356: 1473.

191. Bedford, J.M. (1970). Sperm capacitation and fertilization in mammals. *Biol. Reprod. Suppl.* 2 : 128-158.
192. Soupart, P. (1972). Sperm capacitation : Methodology, hormonal control and the search for a mechanism In : *Biology of Mammalian Fertilization and Implantation* (K.S. Moghissi and E.S.E. Hafez, eds.). Charles C. Thomas, Springfield, Ill.
193. Williams, W.L. (1972). Biochemistry of capacitation of spermatozoa In : *Biology of Mammalian Fertilization and Implantation*. (K.S. Moghissi and E.S.E. Hafez, eds.). Charles C. Thomas, Springfield, Ill.
194. Gordon, M.; Dandekar, P.V.; Bartosceurcz, W.(1974). Ultrastructural localization of surface receptors for concanavalin A on rabbit spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 36 : 211.
195. Bedford, J.M. (1972). Sperm transport, capacitation and fertilization. In *Reproductive Biology* (H. Balin and S. Glasser, eds.) pp. 338-392, Excerpta Medica, Amsterdam.
196. Bernstein, M.H.; Teichman, R.J. (1972). Morphological aspects of capacitation. In : *Biology of Mammalian Fertilization and Implantation*, pp. 126-138 (K.S. Moghissi and E.S.E. Hafez, eds). Charles C. Thomas, Springfield, Ill.
197. Friend, D.S.; Orci, L.; Perrelet, A.; Yanagimachi, R.(1977). Membrane particle changes attending the acrosome reaction in guinea-pig spermatozoa. *J. Cell. Biol.* 74 : 561-577.
198. Hartree, E.F. (1977). Spermatozoa, eggs and proteinases. *Biochem. Soc. Trans.* 5 : 375-394.
199. Gwat in, R.B.L.; Andersen, O.F. (1969). Capacitation of hamster spermatozoa by bovine follicular fluid. *Nature (London)* 224 : 1111-1112.
200. Yanagimachi, R. (1970'b). The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. *J. Reprod. Fert.* 23: 193-196.

201. Chang, M.C. (1957). A detrimental effect of seminal plasma on the fertilizing capacity of sperm. *Nature* 179 : 258-259.
202. Bedford, J.M.; Chang, M.C. (1962). Removal of decapacitation factor from seminal plasma by high-speed centrifugation. *Am J. Physiol.* 202 : 179-181.
203. Williams, W.L.; Abney, T.O.; Chernoff, H.H.; Dukelow, W.R.; Pinsker, M.C. (1967). Biochemistry and physiology of the decapacitation factor. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 2 : 11-21.
204. Weinman, D.E.; Williams, W.L. (1964). Mechanism of capacitation of rabbit spermatozoa. *Nature* 203 : 423-424.
205. Austin, C.R.; Bishop, M.W.H. (1958). Role of the rodent acrosome and perforation in fertilization. *Proc. Royal Soc. B.* 149 : 241-248.
206. Austin, C.R. (1963). Acrosome loss from the rabbit spermatozoa in relation to entry into the egg. *J. Reprod. Fert.* 6 : 313-314.
207. Pikó, L.; Tyler, A. (1964). Fine structural studies of sperm penetration in the rat. *Proc. 5 th. Internat. Cong. Anim. Reprod. and A.I. Trento* 2: 372-377.
208. Barros, C.; Bedford, J.M.; Franklin, M.C.; Austin, C.R. (1967). Membrane vesiculation as a feature of the mammalian acrosome reaction. *J. Cell. Biol.* 34 : C1 - C5.
209. Bedford, J.M. (1967). Experimental requirement for capacitation and observations on ultrastructural changes in rabbit spermatozoa during fertilization. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 2 : 35-48.
210. Jones, R.C. (1973). Changes occurring in the head of boar spermatozoa vesiculation or vacuolation of the acrosome. *J. Reprod. Fert.* 33 : 113-118.
211. Roomans, G.M.; Afzelius, B.A. (1975). Acrosome vesiculation in human sperm. *J. Submicr. Cytol.* 7 : 61-70.

212. Pavlok, A.; Mc Laren, A. (1972). The role of cumulus cells and the zona pellucida in fertilization of mouse eggs in vitro. *J. Reprod. Fert.* 29 : 91-97.
213. Yanagimachi, R.; Noda, Y.D. (1970 d) Fine structure of the hamster sperm head. *Am. J. Anat.* 128 : 367-388.
214. Franklin, L.E.; Barros, C.; Fussel, E.N. (1968). Fine structure of the acrosomal region of golden hamster spermatozoa and the acrosome reaction *J. Cell. Biol.* 39 : 46 a.
215. Gould, S.F.; Bernstein, M.H. (1975). The localization of bovine sperm hyaluronidase. *Differentiat.* 3 : 123-132.
216. Morton, D.B. (1977). Immunoenzymatic studies on acrosin and hyaluronidase in ram spermatozoa. In : *Immunobiology of gametes* (M. Edidin and M.H. Johnson, eds.) (Cambridge University Press, Cambridge, England).
217. Zaneveld, L.J.D.; Robertson, R.T.; Kessler, M.; Williams, W.L. (1971). Inhibition of fertilization in vivo by pancreatic and seminal plasma trypsin inhibitors. *J. Reprod. Fert.* 25 : 387-392.
218. Garner, D.L.; Easton, M.P.; Munson, M.E.; Doane, M.A. (1975). Immunofluorescent localization of bovine acrosin. *J. Exp. Zool.* 191 : 127-131.
219. Morton, D.B. (1975). Acrosomal enzymes : Immunochemical localization of acrosin and hyaluronidase in ram spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 45 : 375-378.
220. Garner, D.L.; Easton, M.P. (1977). Immunofluorescent localization of acrosin in mammalian spermatozoa. *J. Exp. Zool.* 200 : 157-162.
221. Schill, W.B.; Scheluning, W.D.; Fritz, H.; Wendt, V.; Heimbürger, N. (1975). Immunofluorescent localization of acrosin in spermatozoa by boar acrosin antibodies *Die Naturwissenschaften* 11 : 540.

222. Talbot, P.; Franklin, L.E. (1974 a). The release of hialuronidase from guinea-pig spermatozoa during the course of the normal acrosome reaction in vitro. *J. Reprod. Fert.* 39 : 429-432.
223. Stambaugh, R.; Smith, M. (1974). Amino acid content of rabbit acrosomal proteinase and its similarity to human trypsin. *Science* 186 : 745-746.
224. Toyoda, Y.; Chang, M.C. (1974). Fertilization of rat eggs in vitro by epididymal spermatozoa and the development of eggs following transfer. *J. Reprod. Fertil.* 36 : 9-22.
225. Miyamoto, H.; Chang, M.C. (1973 b). The importance of serum albumin and metabolic intermediates for capacitation of spermatozoa and fertilization of mouse eggs in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 32 : 193-205.
226. Rogers, J.; Yanagimachi, R. (1975 b). Retardation of guinea-pig sperm acrosome reaction by glucose : the possible importance of pyruvate and lactate metabolism in capacitation and the acrosome reaction. *Biol. Reprod.* 13 : 568-575.
227. Yanagimachi, R.; Usui, N. (1974). Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea-pig spermatozoa. *Exp. Cell. Res.* 89 : 161-174.
228. Poste, G.; Allison, A.C. (1973). Membrane fusion. *Biochem. Biophys. Acta* 300 : 421-465.
229. Rubin, R.P. (1970). The role of calcium in the release of neurotransmitter substances and hormones. *Pharmacol. Rev.* 22 : 389-418.
230. Papahadjopoulou, D.; Poste, G. (1975). Calcium induced phase separation and fusion in phospholipid membranes. *Biophys. J.* 15 : 945-948.
231. Bishop, M.W.H.; Walton, A. (1960). Spermatogenesis and the structure of mammalian spermatozoa. In *Marshall's Physiology of Reproduction* (A.S.Parkes, ed.), Vol. 1, Chap. 7. Longmans Green and Co, London.

232. Andersen, E. (1974). Comparative aspects of the ultrastructure of the female gamete. *Int. Rev. Cytol.*, Suppl. 4 : 1-70.
233. Braden, A.W.H. (1952). Properties of the membranes of rat and rabbit eggs. *Austral. J. Sci. Res. (B)* 5 : 460-471.
234. Norrevang, A. (1968). Electron microscopic morphology of oogenesis. *Int. Rev. Cytol.* 23 : 113-186.
235. Nicolson, G.L.; Yanagimachi, R.; Yanagimachi, H. (1975). Ultrastructural localization of lectin binding sites on the zona pellucida and plasma membranes of mammalian eggs. *J. Cell Biol.* 66 : 263-274.
236. Glass, L.E.; Hanson, J.E. (1974). An immunologic approach to contraception : Localization of antiembryo and antizona pellucida serum during mouse preimplantation development. *Fertil. Steril.* 25 : 484-493.
237. Szollosi, D. (1967). Development of cortical granules and cortical reaction in rat and hamster eggs. *Anat. Rec.* 159 : 431-446.
238. Fléchon, J.E. (1970). Nature glycoprotéique des granules corticaux de l'oeuf de lapine . *J. Microsc. (Paris)* 9 : 221-242.
239. Zamboni, L. (1970). Ultrastructure of mammalian oocytes and ova. *Biol. Reprod.*, Suppl. 2 : 44-63.
240. Pikó, L. (1969). Gemete structure and sperm entry in mammals, In *Fertilization* (C. Metz and A. Monroy, eds.), Vol. 2 pp.325-403. Academic Press, New York.
241. Nicosia, S.B.; Mikhail, G. (1975). Cumuli oophori in tissue culture : Hormone production, ultrastructure and morphometry of early luteinization. *Fertil. Steril.* 26 : 427-448.
242. Gwatkin, R.B.L.; Carter, H.W.; Patterson, H. (1976 a) Association of mammalian sperm with the cumulus cells and the zona pellucida studied by scanning electron microscopy. In *Scanning Electron Microscopy* (H. Johari and R.P. Becker, eds.), Vol. 2 Part 2, pp. 379-384. IIT Res. Inst., Chicago, Ill.

243. Hartmann, J.F.; Gwatkin, R.B.L.; Hutchison, C.F. (1972). Early contact interactions between mammalian gametes in vitro: Evidence that the vitellus influences adherence between sperm and zona pellucida. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 69 : 2767- 2769.
244. Hartmann, J.F.; Hutchison, C.F. (1974 c). Mammalian fertilization in vitro : sperm induced preparation of the zona pellucida of golden hamster ova for final binding. *J. Reprod. Fertil.* 37: 443-445.
245. Gwatkin, R.B.L.; Williams, D.T. (1976 a). Receptor activity of the solubilized zona pellucida. Ninth Ann. Meeting, Soc. Study Reprod. Philadelphia.
246. Gwatkin, R.B.L.; Williams, D.T. (1976 b). Receptor activity of the solubilized hamster and mouse zona pellucida before and after the zona reaction. *J. Reprod. Fertil.* 49 : 55-59.
247. Brown, C.R.; Hartree, E.F. (1974). Distribution of a trypsin-like proteinase in the ram spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 39: 195-198.
248. Bedford, J.M. (1968). Ultrastructural changes in the sperm head during fertilization in the rabbit. *Amer. J. Anat.* 123 : 329-358.
249. Yanagimachi, R.; Noda, Y.D. (1970 b). Ultrastructural changes in the hamster sperm head during fertilization. *J. Ultrastructure Res.* 31 : 465-485.
250. Barros, C.; Fujimoto, M.; Yanagimachi, R. (1973). Failure of zona penetration of hamster spermatozoa after prolonged preincubation in a blood serum fraction. *J. Reprod. Fertil.* 35 : 89-95.
251. Brown, C.R.; Hartree, E.F. (1976). Effects of acrosin inhibitors on the soluble and membrane bound forms of ram acrosin, and a reappraisal of the role of the enzyme in fertilization. *Z. Physiol. Chem.* 357 : 57-65.
252. Yang, W.H.; Lin, L.L.; Wang, J.R.; Chang, M.C. (1972). Sperm penetration through zona pellucida and perivitelline space in the hamster. *J. Exp. Zool.* 179 : 191-206.

253. Yanagimachi, R. (1966). Time and process of sperm penetration into hamster ova in vivo and in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 11 : 359-370.
254. Yanagimachi, R.; Noda, Y.D. (1972). Scanning electron microscopy of golden hamster spermatozoa before and during fertilization. *Experientia.* 28 : 69-72.
255. Thompson, R.S.; Moore-South, D.; Zamboni, L. (1974). Fertilization of mouse ova in vitro : An electron microscopic study. *Fertil. Steril.* 25 : 222-249.
256. Yanagimachi, R. (1977). Specificity of sperm-egg interaction In : the Immunobiology of the Gametes (Edidin, M., and Johnson M.H., eds.) Cambridge University Press, Cambridge, England.
257. Hanada, A.; Chang, M.C. (1972). Penetration of hamster and rabbit zona-free eggs by rat and mouse spermatozoa with special reference to sperm capacitation. *J. Reprod. Fertil.* 46 : 239-241.
258. Gwatkin, R.B.L.; Rasmusson, G.H.; Williams, D.T. (1976 b). Induction of the cortical reaction in hamster eggs by membrane active agents. *J. Reprod. Fertil.* 47 : 299-303.
259. Braden, A.W.H.; Austin, C.R.; David, H.A. (1954). The reaction of the zona pellucida to sperm penetration. *Austral. J. Biol. Sci.* 7 : 391-409.
260. Steinhardt, R.A.; Leendin, L.; Mazia, D. (1971). Bioelectric responses of the echinoderm egg to fertilization. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 68 : 2426-2430.
261. Steinhardt, R.A.; Epel, D.; Carroll, E.J.; Yanagimachi, R. (1974). Is calcium ionophore a universal activator for unfertilized eggs. *Nature (London)* 252 : 41-43.
262. Graham, C.F. (1974). The production of parthenogenetic mammalian embryos and their use in biological research. *Biol. Rev.* 49: 399-422.



263. Gordon, M.; Fraser, L.R.; Dandekar, P.V. (1975 b). The effect of ruthenium red and Concanavalin A on the vitelline surface of fertilized and unfertilized rabbit ova. *Anat. Rec.* 181 : 95-112.
264. Austin, C.R.; Braden, A.W.H. (1956). Early reactions of the rodent egg to spermatozoon penetration. *J. Exp. Biol.* 33 : 358-365.
265. Barros, C.; Yanagimachi, R. (1971). Induction of zona reaction in golden hamster eggs by cortical granule material. *Nature (London)* 233 : 268-269.
266. Gwatkin, R.B.L.; Williams, D.T.; Hartmann, J.F.; Kniazuk, M. (1973 b ). The zona reaction of hamster and mouse eggs. Production in vitro by a trypsin like protease from cortical granules. *J. Reprod. Fertil.* 32 : 259-265.
267. Gulyas, B.J. (1974). Cortical granules in artificially activated (Parthenogenetic) rabbit eggs. *Amer. J. Anat.* 140 : 577-582.
268. Gwatkin, R.B.L.; Williams, D.T. (1974). Heat sensitivity of the cortical granule protease from hamster eggs. *J. Reprod. Fertil.* 39 : 153-155.
269. Yanagimachi, R.; Chang, M.C. (1961). Fertilizable life of golden hamster ova and their morphological changes at the time of losing fertilizability. *J. Exp. Zool.* 148 : 185-197.
270. Szollosi, D. (1975). Mammalian eggs aging in the fallopian tubes In *Aging Gametes* (R.J. Blandau, ed.). pp. 98-121. Karger, Basel.
271. Yanagimachi, R.; Noda, Y.D. (1970 a). Electron microscopic studies of sperm incorporation into the golden hamster eggs. *Amer. J. Anat.* 128 : 429-462.
272. Thibault, C.; Gerard, M. (1973). Cytoplasmatic and nuclear maturation of rabbit oocytes in vitro. *Ann Biol. Anim. Biochem. Biophys.* 13 (Suppl) : 145-156.
273. Stefanini, M.; Oura, C.; Zamboni, L. (1969). Ultrastructure of fertilization in the mouse. 2. Penetration of sperm into the ovum. *J. Submicr. Cytol.* 1 : 1-23.

274. Garberi, J.C.; Fontana, J.D.; Blaquier, J.A. (1982). Carbohydrate composition of specific rat epididymal protein. *International Journal of Andrology*. 5 : 619-626.
275. Alumot, E.; Lensky, Y.; Schlinder, H. (1971). Separation of protein in the epididymal fluid of the ram, *J. Reprod. Fertil.* 25: 349.
276. Orgebin-Crist, M.C.; Jahad, N. (1979). The maturation of spermatozoa in organ culture : Inhibition by androgens and inhibitors of ribonucleic acid and protein synthesis. *Endocrinology* 103 : 46-53.
277. Orgebin-Crist, M.C.; Jahad, N. (1979). The maturation of rabbit epididymal spermatozoa in organ culture : Stimulation by epididymis cytoplasmatic extracts. *Biol. Reprod.* 21 : 511-516.
278. Kohane, A.C.; Garberi, J.C.; Cameo, M.S.; Blaquier, J.A. (1979). Quantitative determination of specific proteins in rat epididymis. *Journal of steroid Biochemistry*. 11 : 671-674.
279. Kohane, A.C.; González Echeverría, M.C.; Piñeiro, L. Blaquier, J.A. (1980). Interaction of proteins of epididymal origin with spermatozoa. *Biol. Reprod.* 23 : 737-742.
280. Eng, L.A.; Oliphant, G. (1978). Rabbit sperm reversible decapacitation by membrane utilization with a highly purified glycoprotein from seminal plasma. *Biol. Reprod.* 19 : 1083.
281. Bavister, B.D.; Rogers, B.J.; Yanagimachi, R. (1978). The effects of cauda epididymal plasma on the motility and acrosome reaction of hamster and guinea-pig spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod.* 19 : 358.
282. Cameo, M.S.; González Echeverría, M.F.; Blaquier, J.A. and Burgos, M.H. (1983). Ultrastructural localization of epididymal protein DE on rat spermatozoa. Its face after induced acrosome reaction (aún no publicado).

283. Katzenellenbogen, B.S. and Gorski, J. (1975). Methods for assessing estrogen effects on new uterine protein synthesis in vitro. *Methods in Enzymology* 36 : 444-445.
284. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275.
285. Raymond, S. and Weintraub, J. (1959). Acrylamide gel as a supporting medium for some electrophoresis. *Science* 130 : 711.
286. Rodbard, D. and Chrambach, A. (1974). Quantitative polyacrilamide gel electrophoresis : mathematical and statistical analysis of data. In : *Electrophoresis and Isoelectric Focusing in Polyacrylamide Gel*, ch. 2, pp. 28-62. Eds. R.C. Allen and H. R. Maurer Walter de Gruyter, Berlin.
287. Zacharius, R.M.; Zell, T.E.; Morrison, J.H. and Woodlock, J.J. (1969). Glycoprotein staining following electrophoresis in acrylamide gels. *Analyt. Biochem.* 30 : 148-161.
288. Yanagimachi, R. and Chang, M.C. (1964). In vitro fertilization of golden hamster ova. *J. Expt. Zool.* 156 : 361-376.
289. Brinster, R.L. (1971). In *The Biology of the Blastocyst*, R.J. Blandau, ed. Univ. Chicago Press, Chicago, P. 306.
290. Lubicz-Nawrocki, C.M. (1970). Transuterine migration of spermatozoa in the Golden hamster (*Mesocricetus Auratus*). *J. Reprod. Fertil.* 23 : 197-201.
291. Sternberger, L.A.; Hardy, P.H., Jr.; Cuculis, J.J. and Meyer, H.G., (1970). The unlabelled anti body enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex. (horseradish peroxidase-anti horseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem. Cytochem.* 18 : 315-333.

292. Mann, H.B. and Whitney, D.R. (1947). On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Ann. Math. Statist.* 18 : 50-60.
293. Cochran, W.G. (1952). The  $X^2$  test of goodness of fit. *Ann. Math. Statist.* 23 : 315-345.
294. Beatty, R.A. (1967). Parthenogenesis in vertebrates. In : *Fertilization* (C. Metz and A. Monroy, eds.) vol. 1 Chap. 9, pp 413-440. Academic Press, New York.
295. Orgebin-Crist, M.C. and Tichenor, P.L. (1973). Effect of Testosterone on sperm maturation in vitro . *Nature* 245 : 328-329.
296. Tezón, J.G. and Blaquier, J.A. (1981). The organ culture of human epididymal tubular and their response to androgens. *Molec. Cell Endocr.* 21 : 233-242.
297. Moore, H.D.M. (1981). Effects of castration on specific glycoprotein secretions of the epididymis in the rabbit and hamster. *J. Reprod. Fert.* 61 : 347-354.
298. Nicander, L. (1965). An electron microscopical study of absorbing cells in the posterior caput epididymis of rabbit. *Z. Zell forsh. Mikroskop. Anat.* 66 : 829-847.
299. Nicander, L. (1970). On the morphological evidence of secretion and absorption in the epididymis. *Morphological aspects of Andrology*, vol. 1, 121 (A.F. Holstein and E. Horstmann, editors) (Berlin : Grosse Verlag).
300. Hoffer, A.P., Hamilton, D.W. and Faucett, D.W. (1973). The ultrastructure of the principal cells and intra epithelial leucocytes in the initial segment of the rat epididymis. *Anat. Rec.* 127 : 169-202.
301. Moore, H.D.M. and Bedford, J.M. (1979 a). Shortern effects of androgen with drawall on the structure of different epithelial cells in the rat epididymis. *Anat. Rec.* 193 : 293-312.

302. Cummins, J. M.; Bernstein, M.H. and Teichman, R.J. (1974) High and electron microscope studies on lipid stained by malachite green in the male reproductive tract of the rabbit, hamster and mungoose. *J. Reprod. Fert.* 41 : 75-83.
303. Mann, T. (1974). Biochemical aspects of sperm maturation and survival. In : *Male Fertility and Sterility* (R.E. Mancini and L. Martini, eds.). Academic Press, London, New York, San Francisco pp 89-105
304. Martan, J. (1969). Epididymal histochemically and Physiology. *Biol. Reprod. Suppl.* 1 : 134-154.
305. Hamilton, D.W. (1972). The mammalian epididymis. In : *Reproductive Biology*, edited by H. Balin and S. Glasser. Amsterdam : Excerpta Media Foundation, p. 268-337.
306. Jones, R. (1974) Absorption and secretion in the cauda epididymis of the rabbit and the effects of degenerating spermatozoa on epididymal plasma after castration. *J. Endocrinol.* 63 : 157-165.
307. Jones, R. and Glover, T.D. (1973). The effect of castration on the composition of rabbit epididymal plasma. *J. Reprod. Fert.* 34 : 405-414.
308. Hughes, R.C. and Sharon, N. (1978). Carbohydrates recognized Nature. 274 : 637-638.
309. Frazier, W. and Glaser, L. (1979). Surface components and cell recognition. *Ann. Rev. Biochem.* 48 : 491-523.
310. Bretscher, M.S. (1971). Major human erythrocyte glycoprotein spans the cell membrane. *Nature, New Biol.* 231 : 229-232.
311. Vacquier, V.D. and Moy, G.W. (1977). Isolation of bindin, the protein responsible for adhesion of sperm to sea urchin eggs. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 74 : 2456-2460.
312. Aketa, K.; Tsuzuki, H. and Onitake, K. (1968). Characterization of the sperm-binding protein from sea urchin egg surface. *Expl. Cell Res.* 50 : 676-679.

313. Glabe, C.G. and Vacquier, V.D. (1978). Egg surface glycoprotein receptor for sea urchin sperm binding. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75 : 881-885.
314. Glabe, C.G. and W.J. Lennarz (1981). Isolation and partial characterization of a high molecular weight glycoconjugate, derived from the egg surface, which is implicated in sperm-egg adhesion. *J. Supramol. Struct. Cell Biochem.* 15 : 387-394.
315. Bleil, J.D. and Wassarman, P.M. (1980). Mammalian sperm-egg interaction : Identification of a glycoprotein in mouse egg zonal pellucidae possessing receptor activity for sperm. *Cell* 20 : 873-882.
316. Peterson, R.N.; Russell, L.; Bundman, D. and Freund, M. (1979). Sperm-egg interaction : evidence for boar sperm plasma membrane receptors for porcine zona pellucida-*Science* 207 : 73-74.
317. Yanagimachi, R.; Okada, A. and Tung, K.S.K. (1981) Sperm autoantigens and fertilization : II. Effects of anti-guinea pig sperm autoantibodies on sperm ovum interactions. *Biol. Reprod.* 24 : 512-518.
318. Saling, P.M. (1982). Development of the ability to bind to zonae pellucidae during epididymal maturation : Reversible immobilization of mouse spermatozoa by lanthanum. *Biol. Reprod.* 26 : 429-436.
319. Fournier-Delpech, S.; Courtens, J.L.; Pisselet, C.L. Delaleu, B. and Courot, M. (1982). Acquisition of zona binding by ram spermatozoa during epididymal passage, as revealed by interaction with rat oocytes *Gamete Res.* 5 : 403-408.
320. Sullivan, R.; St-Jacques, S.; Chapdelaine, A.; Roberts, K.D. and Bleau, G. (1983). Detection of a sperm membrane protein with an affinity for the zona pellucida. *Biol. Reprod. Suppl.* 1, vol. 28. Abst. N<sup>o</sup> 13.
321. Bedford, J.M. (1967). Effect of duct ligation on the fertilizing ability of spermatozoa from different regions of the rabbit epididymis. *J. Exp. Zool.* 166 : 271.

322. González Echeverría, M.F.C.; Cuasnicú, P.S.; Piazza, A.; Piñeiro, L. and Blaquier, J.A. (1983). Direct effect of an androgen- free epididymal protein extract on sperm fertilizing capacity in vivo and in vitro. (aún no publicado).
323. Bedford, J.M. (1978). Sperm/egg interaction : the specificity of human spermatozoa. *Anat. Rec.* 188 : 477-488.
324. Schinell, E.D. and Gulyas, B.J. (1980). Mammalian sperm-egg recognition and binding in vitro. I. Specificity of sperm interactions with live and fixed eggs in homologous and heterologous inseminations of hamster, mouse and guinea pig oocytes. *Biol. Reprod.* 23 : 1075-1085.
325. Niwa, K. and Chang, M.C. (1974 b). Various conditions for the fertilization of rat eggs in vitro. *Biol. Reprod.*, 11 : 463.
326. Holtz, W.; Smidt, D. (1976). The fertilizing capacity of epididymal spermatozoa in the pig. *J. Reprod. Fert.* 46 : 227-229.
327. Hinton, B.T. and Howards, S.S. (1981). Permeability characteristics of the epithelium in the rat caput epididymis. *J. Reprod. Fert.* 63 : 96-99.
328. Weininger, R.B.; Fisher, S.; Rifkin, J. and Bedford, J. M. (1982). Experimental studies on the passage of specific IgG to the lumen of the rabbit epididymis. *J. Reprod. Fertil.* 66 : 251-258.
329. Tzartos, S.J. (1979). Inhibition of in vitro fertilization of intact and denuded hamster eggs by univalent antisperm antibodies *J. Reprod. Fertil.* 55 : 447-455.
330. Moore, H.D.M. (1981). Glycoprotein secretions of the epididymis in the rabbit and hamster: localization an epididymal spermatozoa and the effect of specific antibodies in fertilization in vivo. *J. Exp. Zool.* 215 : 77-85.
331. Ahuja, K.K. (1982). Fertilization studies in the hamster. The role of cell-surface carbohydrates. *Exptl. Cell Research.* 140 : 353-362.

332. Huang, T.T.F. (Jr), Ohzu, E. and Yanagimachi, R. (1982). Evidence suggesting that L-Fucose is part of a recognition signal for sperm-zona pellucida attachment in mammals. Gamete Research 5 : 355-361.
333. Tezón, J.; Vazquez, M.H.; de Larminat, M.; Piñeiro, L.; Blaquier, J.A. (1983) (no publicado).



## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge A. Blaquier por dirigir y estimular permanentemente a sus colaboradores, dándonos la formación y libertad de trabajo esenciales para todo futuro investigador independiente.

Al Dr. Eduardo H. Charreau, por haberme brindado la oportunidad de ingresar al Instituto de Biología y Medicina Experimental, contando desde entonces con su valioso apoyo.

Al Dr. Carlos P. Lantos por el constante interés y dedicación brindados a lo largo de toda mi carrera.

En forma muy especial a la Lic. Fernanda González Echeverría, no sólo por haber participado activamente en cada uno de los estudios presentados, sino por haber sido una compañera ejemplar a lo largo de todos estos años.

De igual modo agradezco a la Lic. Alejandra Piazza por su significativa participación en la segunda parte de este trabajo y por la incondicionalidad de su ayuda tanto laboral como humana.

A la Lic. Lucrecia Piñeiro y la Dra. Mónica S. de Cameo por su colaboración en la parte experimental de este trabajo y junto a los restantes miembros del laboratorio, Dra. Mariana de Larminat, Dr. Jorge Tezón, Lic. Mónica H. Vázquez, Esteban Ramella y Lic. Adriana Dawidowski por permitir que el trabajo diario se lleve a cabo en un clima de solidaridad y amistad permanentes.

A las Sras. Patricia D. de Sánchez y Elsa M. de Morra, por haber podido contar en todo momento con su responsable y eficiente ayuda técnica y al Sr. Federico De Martino por su excelente labor dactilográfica.

Al Director Dr. Virgilio Foglia y a cada uno de los integrantes del Instituto de Biología y Medicina Experimental por haberme facilitado los elementos y la cooperación necesarias para el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Alcira Aragonés por su colaboración como consejera de estudios.

Al Dr. Héctor Chemes por su colaboración en los estudios histológicos y al Ing. Jorge F. Cordero por su asesoramiento en el análisis estadístico de los datos.

Finalmente agradezco a mi esposo, mis padres, mi hermana, mis amigos y a todos aquellos quienes con sus consejos, paciencia y comprensión hicieron posible la realización de esta tesis.