

Tesis de Posgrado

Comportamiento de una glicoproteína epididimaria durante la capacitación de los espermatozoides y su participación en el proceso de fertilización

Rochwerger, Leonora

1991

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas 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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Rochwerger, Leonora. (1991). Comportamiento de una glicoproteína epididimaria durante la capacitación de los espermatozoides y su participación en el proceso de fertilización. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2425_Rochwerger.pdf

Cita tipo Chicago:

Rochwerger, Leonora. "Comportamiento de una glicoproteína epididimaria durante la capacitación de los espermatozoides y su participación en el proceso de fertilización". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1991.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2425_Rochwerger.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

COMPORTAMIENTO DE UNA GLICOPROTEINA
EPIDIDIMARIA DURANTE LA CAPACITACION
DE LOS ESPERMATOZOIDES Y SU
PARTICIPACION EN EL PROCESO
DE FERTILIZACION

Lic. Leonora Rochwerger

Directora: Dra. Patricia S. Cuasnicú

*Tesis presentada para optar al título de
Doctora en Ciencias Biológicas.*

1991

*Tesis
2425
j 2.*

Instituto de Biología y Medicina Experimental
Buenos Aires, Argentina

Para Héctor

A mis padres y hermanos

** Nuestras horas son minutos
cuando esperamos saber
y siglos cuando sabemos
lo que se puede aprender.**

Antonio Machado

INDICE

Prefacio

I. INTRODUCCION	1
I.1. Las células germinales.	5
I.1.1. Origen en el desarrollo embrionario.	5
I.1.2. Ciclo de vida de las células germinales.	6
I.2. Descripción del ovocito y el espermatozoide.	10
I.2.1. Estructura general del ovocito.	10
I.2.2. Estructura general del espermatozoide.	18
I.3. Maduración de los espermatozoides en el epidídimo.	33
I.3.1. Adquisición de capacidad fertilizante.	36
I.3.2. Cambios estructurales y funcionales de los espermatozoides en el epidídimo.	38
I.3.3. Modificaciones de la membrana plasmática durante la maduración.	42
I.4. Eyaculación de los espermatozoides.	54
I.5. Capacitación de los espermatozoides.	58
I.5.1. Eventos que ocurren durante la capacitación.	63
I.5.2. Decapitación y factores decapitantes.	67
I.6. Consecuencias de la capacitación.	69
I.6.1. Hiperactivación de los espermatozoides.	70
I.6.2. Reacción acrosomal.	72
I.7. Penetración del espermatozoide a través de las envolturas del ovocito.	82
I.7.1. Penetración a través del cumulus oophorus.	82
I.7.2. Unión y pasaje a través de la zona pellucida.	83
I.8. Fusión del espermatozoide con el ovocito.	89
I.8.1. Sitios de iniciación de la fusión entre el espermatozoide y el ovocito.	89
I.8.2. Motilidad del espermatozoide y fusión.	93
I.8.3. Especificidad de especie en la fusión.	94
I.8.4. Efecto de diversos agentes sobre la fusión.	95
I.8.5. Modelo hipotético de la secuencia de eventos involucrados en la fusión.	96
I.9. Eventos posteriores a la fusión.	98
I.9.1. Activación del ovocito.	98
I.9.2. Liberación de los gránulos corticales y bloqueo de la polispermia.	99
I.9.3. Descondensación del núcleo del espermatozoide en el ooplasma.	101
I.9.4. Desarrollo y asociación de los pronúcleos masculino y femenino.	103
I.10. OBJETIVOS	107

II. MATERIALES Y METODOS	116
II. 1. Animales.	117
II. 2. Obtención de espermatozoides epididimarios.	117
II. 3. Extracción de proteínas de superficie de espermatozoides provenientes del cauda epididimario.	119
II. 4. Extracción de proteínas totales de membrana de espermatozoides provenientes del cauda epididimario.	121
II. 5. Extracción de proteínas de membrana periféricas e intrínsecas en forma secuencial.	122
II. 6. Preparación de citosoles de epidídimo y testículo de rata.	122
II. 7. Separación electroforética de las muestras.	123
II. 7.1. Preparación de las soluciones madres.	124
II. 7.2. Armado de los geles.	125
II. 7.3. Condiciones de corrida.	126
II. 8. Electrotransferencia de las proteínas.	128
II. 8.1. Revelado de la nitrocelulosa.	128
II. 9. Inmunofluorescencia indirecta (IIF) de espermatozoides.	129
II.10. Capacitación in vitro de los espermatozoides.	131
II.10.1. Preparación del medio.	131
II.10.2. Obtención e incubación in vitro de los espermatozoides.	134
II.10.3. Evaluación de motilidad y viabilidad de los espermatozoides.	135
II.10.4. Incubación de los espermatozoides a 4°C.	136
II.11. Análisis de la proteína DE presente en espermatozoides por enzimo-inmuno ensayo (ELISA).	137
II.12. Ensayos de migración y exposición de la proteína DE.	139
II.13. Tratamiento con proteasas y agentes permeabilizantes.	141
II.14. Incubación en ausencia de los iones calcio y bicarbonato.	142
II.15. Efecto de los distintos tratamientos inductores de la reacción acrosomal sobre la localización de DE.	143
II.15.1. Tratamiento con el ionóforo de Ca ²⁺ A23187.	143
II.15.2. Tratamiento con ciclos de congelamiento-descogelamiento.	144
II.15.3. Tratamiento con zona pellucida.	144
II.16. Capacitación de los espermatozoides in vivo.	149
II.16.1. Superovulación de las hembras.	149
II.16.2. Sistema de inseminación artificial uterina.	149
II.16.3. Sistema de apareo.	150
II.17. Recuperación de espermatozoides y ovocitos luego de la capacitación in vivo.	152

II.18.	Ensayos de fertilización y fusión in vitro.	153
II.18.1.	Obtención de ovocitos.	153
II.18.2.	Ensayo de fertilización de ovocitos intactos.	157
II.18.3.	Ensayo de fusión a ovocitos sin zona pellucida.	158
II.18.4.	Ensayos del efecto de anti-DE sobre la penetración de ovocitos sin zona pellucida in vitro.	159
II.18.5.	Efecto del agregado de la proteína DE purificada en el ensayo de fusión in vitro.	161
II.19.	Ensayos de unión al oolema.	162
II.19.1.	Efecto de anti-DE sobre la unión de los espermatozoides al oolema.	163
II.19.2.	Efecto del agregado de la proteína DE sobre la unión de los espermatozoides al oolema.	164
II.20.	Inmunofluorescencia de ovocitos preincubados con la proteína DE.	164
II.21.	Incubación de espermatozoides inmaduros bajo condiciones capacitantes in vitro.	165
II.21.1.	Incubación de espermatozoides provenientes del corpus distal con la proteína DE.	167
III.	RESULTADOS	
	PRIMERA PARTE: Estudio del comportamiento de la proteína DE durante el proceso de capacitación de los espermatozoides.	168
III.1.	Características de la proteína DE presente en la superficie de los espermatozoides maduros.	169
III.1.1.	Análisis por electroforesis e inmuno-electrotransferencia.	169
III.1.2.	Análisis por inmunofluorescencia.	174
III.2.	Estudio del destino de la proteína DE durante el proceso de capacitación in vitro.	177
III.2.1.	Establecimiento de las condiciones adecuadas para la capacitación in vitro.	178
III.2.2.	Cinética del proceso de capacitación in vitro.	190
III.2.3.	Análisis por el ensayo de ELISA de la proteína DE presente en espermatozoides capacitados.	191
III.2.4.	Presencia y localización de la proteína DE en los espermatozoides capacitados in vitro.	195

III.2.5.	Aparición de espermatozoides con DE en el segmento ecuatorial en función del tiempo de capacitación.	199
III.2.6.	Influencia de la temperatura sobre la aparición de DE en el segmento ecuatorial.	200
III.3.	Posibles causas de la aparición de DE en el segmento ecuatorial.	204
III.3.1.	Migración de DE al segmento ecuatorial.	204
III.3.2.	Evaluación de la posible exposición de la proteína DE.	208
III.4.	Vinculación entre la migración de DE y la ocurrencia de la reacción acrosomal.	212
III.4.1.	Efecto de la falta de calcio y bicarbonato sobre la redistribución de DE.	213
III.4.2.	Efecto de tratamientos inductores de la reacción acrosomal sobre la redistribución de DE.	216
III.5.	Características de la proteína DE localizada en el segmento ecuatorial.	227
III.5.1.	Movilidad electroforética de la proteína DE localizada en el segmento ecuatorial.	229
III.5.2.	Análisis de la cantidad de proteína DE presente en espermatozoides tratados con ionóforo A23187.	232
III.5.3.	Redistribución de la proteína DE en espermatozoides sometidos a alta fuerza iónica.	234
III.6.	Comportamiento de la proteína DE bajo condiciones capacitantes in vivo.	235
III.6.1.	Establecimiento de los sistemas a utilizar para la capacitación in vivo.	235
III.6.2.	Localización de la proteína DE en espermatozoides capacitados in vivo.	240

IV. RESULTADOS

SEGUNDA PARTE: Estudio de la función biológica de la proteína DE.

IV.A.	Estudio de la participación de DE en la interacción entre el espermatozoide y el ovocito.	247
IV.A.1.	Penetración de ovocitos sin zona pellucida en función de la concentración de espermatozoides.	247
IV.A.2.	Efecto del anticuerpo anti-DE sobre la penetración a ovocitos sin zona pellucida.	251
IV.A.3.	Efecto del anticuerpo anti-DE sobre la unión de los espermatozoides al oolema.	254

IV.A.4. Efecto de la adición de proteína DE a ovocitos sin zona pellucida sobre el proceso de fusión.	262
IV.A.5. Efecto de la adición de DE a ovocitos sin zona pellucida sobre la unión de espermatozoides capacitados.	265
IV.A.6. Estudio de la interacción de la proteína DE con la membrana plasmática del ovocito.	269
IV.A.7. Presencia de antígenos reconocidos por anti-DE en espermatozoides de otras especies.	273
IV.B. Estudio de la participación de la proteína DE en el proceso de maduración epididimaria.	276
IV.B.1. Capacidad de fusión al ovocito en función de la maduración de los espermatozoides	276
IV.B.2. Efecto de la proteína DE sobre la capacidad de fusión de espermatozoides del corpus distal.	280
IV.B.3. Efecto de la proteína DE sobre la unión de los espermatozoides del corpus distal al oolema.	281
V. DISCUSION.	287
VI. CONCLUSIONES.	352
BIBLIOGRAFIA	355

*"Son tres los Maestros:
nuestros padres, nuestros instructores,
y nuestros compañeros."*

Sefer Hasidim

Prefacio

Quiero comenzar este trabajo de tesis expresando mi más profundo agradecimiento a la Dra. Patricia Cuasnicú, quien no solamente fue responsable, día a día desde el comienzo, de mi más completa formación científica, sino que supo transmitirme la verdadera pasión por la investigación, por la búsqueda permanente de respuestas y de nuevas preguntas. Quiero agradecerle su actitud sumamente crítica, tan constructiva como formadora, así como la libertad de trabajo y confianza que siempre recibí. Quiero agradecer sus permanentes sugerencias y lecciones, tanto en el laboratorio como fuera de él y el haberme participado permanentemente de sus decisiones. Es difícil resumir aquí cuánto debo hacia quien fue tanto más que una Directora de tesis. Para Paty, nuevamente, mi más profunda gratitud.

Deseo agradecer a las autoridades del Instituto de Biología Experimental (IBYME) el permitirme desarrollar este trabajo en sus instalaciones.

Quiero dar gracias al Dr. Jorge Blaquier, por el tiempo y colaboración prestados en tantas ocasiones.

Especialmente, quiero agradecer al Dr. Jorge Tezón, por su inagotable generosidad, cooperación y sus útiles sugerencias.

Deseo extender mi agradecimiento a los Dres. Lino Baraño, Eduardo Charreau y Sully Tesone por sus sugerencias y colaboración prestadas a lo largo de todos estos años, así como también al Dr. Carlos Lantos por la tan dichosa presentación que me permitió iniciar mi trabajo en el IBYME.

Quiero expresar mi enorme reconocimiento y agradecimiento a todos los miembros y compañeros del IBYME por las inacabables y siempre halladas sugerencias, ayudas y soluciones, así como también por el ambiente de trabajo diario tan agradable y solidario.

A todos los integrantes de los laboratorios de la Dra. P. Cuasnicú y del Dr. J. Tezón, por su solidaridad permanente, por el ambiente de trabajo tan agradable y, particularmente, por la inmensa paciencia y tolerancia que me han brindado durante tantos días de trabajo compartidos.

En particular, quisiera agradecer:

A Patricia Miranda, enormemente, por ser la mejor compañera que haya tenido jamás. Por las horas de trabajo diario y nocturno compartidas. Por ser tan buena amiga, siempre dispuesta a escuchar y colaborar con los demás.

A Pablo Visconti, por la amistad que nos une, por su permanente estímulo y transmisión de entusiasmo, así como por sus sabias enseñanzas y sugerencias.

A Daniela Conesa, por su gran compañerismo, por su tolerancia en los primeros meses de trabajo compartidos, por las correcciones de las nunca acabables cartas en inglés.

A Stella Delcourt, por la enorme y eficiente colaboración prestada a lo largo de todos estos años, por sus pacientes enseñanzas de los primeros tiempos, por su calidez.

A Debora Cohen, por la gran colaboración prestada en los experimentos de redistribución y reacción acrosomal, por sus permanentes sugerencias, paciencia y generosidad.

A Silvina Pérez Martínez, por los tan agradables días de trabajo compartidos.

A Patricia Delcourt, por su compañerismo y estímulo. Por la purificación de la proteína DE utilizada en este trabajo.

A Adriana Dawidowsky, Elsa M. de Morra, Adriano Brandelli, Licia Battaglia y Guillermo Lanuza por la cordialidad y cooperación de todos los días.

A Liliana Daín, Patricia Saragüeta y Paula Stein quienes, han sido excelentes compañeras en el trabajo diario.

Quero dar gracias también a Lucrecia Piñeiro, por la gran colaboración prestada en mi primer año de trabajo.

A María Laura Pisano y Mary di Vietro, por la inmensa y tan valorable colaboración en las búsquedas bibliográficas, imprescindible para la realización de esta tesis.

A Marcelo Lamamí y Ricardo Damnoti por su inagotable paciencia y gran ayuda en la preparación del material fotográfico y gráfico para las presentaciones a congresos y preparación de esta tesis.

A la Dra. M. Cameo, por el asesoramiento en la realización de la técnica de inmunofluorescencia.

A Alejandro Serini, de Biotrón, por su asesoramiento técnico y provisión de equipos de fluorescencia.

Al Dr. R. Poncio, de la Facultad de Medicina, por la desinteresada colaboración en la obtención de microfotografías de fluorescencia.

Al personal de bioterio, por facilitar la obtención de los animales utilizados en la realización de este trabajo.

Al personal de secretaría, limpieza y mantenimiento, por facilitar permanentemente el trabajo diario.

Quisiera agradecer también a mi gran amiga, Verónica Beyreuther.

A mis padres, por la nobleza de sus enseñanzas, por su sabiduría y ejemplo. Quiero agradecer tanto a ellos como a mis hermanos, Gustavo, Andrés y Paula, el haberme enriquecido tanto, durante tantos años.

Finalmente, no existen palabras suficientes para expresar el agradecimiento que siento hacia mi esposo y compañero, Héctor, quien palmo a palmo compartió y sufrió la realización de esta tesis. Quiero agradecer su confianza, paciencia y permanente presencia. Por nuestro futuro.

Abreviaturas

AC	anhidrasa carbónica
B1	corpus proximal del epidídimo
B2	corpus distal del epidídimo
D	región dorsal del acrosoma
BSA	albúmina sérica bovina
DMSO	dimetilsulfóxido
CA	capuchón acrosomal
E.S.	error standard
EGTA	ácido etilenglicol-bis (β -aminoetil éter) tetraacético
ELISA	enzimo-inmuno ensayo
esp	espermatozoide
FITC	isotiocianato de fluoresceína
gr	gramo
H	caput del epidídimo
hCG	gonadotropina coriónica humana
IIF	inmunofluorescencia
l	litro
M	molar
mg	miligramo
ml	mililitro
mM	milimolar
NIgG	IgG de conejo normal
OA	ovoalbúmina
ov	ovocito
PA	región postacrosomal
PBS	solución tampón salina de fosfato
pg	picogramos
PMS	gonadotropina de suero de yegua preñada

PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVA	polivinilalcohol
PVP	polivinilpirrolidona
RFM	Medio para la fertilización de rata
SCAN	suero de cabra normal
SE	segmento ecuatorial
SWM	Medio de lavado con sacarosa
T	cauda del epidídimo
TCh	Medio Toyoda & Chang
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
Tris	tris[hidroximetil]amino-metano
ug	microgramo
ul	microlitro
uM	micromolar
ZP	medio de solubilización de zona pellucida
αDE	anti-DE, anticuerpo policlonal específico contra DE
α1	α-lactalbúmina
2do. anticuerpo	anti-IgG de conejo

I. Introducción

I. INTRODUCCION

A mediados del siglo XIX se observó, por primera vez, la penetración de un ovocito de mamífero por un espermatozoide. Sólo a partir de este momento se estableció que la unión de las gametas femenina y masculina iniciaba el desarrollo de un nuevo ser. Hasta entonces existía una gran confusión acerca del papel desempeñado por cada uno de los sexos en el proceso de reproducción. Tal como es narrado por Gwatkin (1977), entre los antiguos Griegos se creía que el semen y la sangre menstrual se combinaban para formar el embrión y las membranas fetales. Aristóteles (384-322 AC) en su libro *Historia Animalium*, sugirió que el semen contribuía a la concepción de un nuevo organismo de un modo no material dando únicamente forma al embrión en desarrollo, al cual él consideraba proveniente en forma física, enteramente de la madre. La figura mas sobresaliente, cinco siglos luego de Aristóteles, dedicada al estudio de la embriología entre otras disciplinas médicas, fue el médico griego Galeno (130-200 DC) quien, en forma opuesta a la visión de Aristóteles, creía que el embrión se formaba de los elementos materiales de ambos padres. Los naturalistas de la Edad Media y del Renacimiento basaban sus ideas en parte en Aristóteles, y en parte en los conceptos de Galeno y sus seguidores.

Hacia el siglo XVII, el médico inglés, William Harvey, publicó *De Generatione Animalium* (1651), en cuya primera página aparece Júpiter, el dios supremo Romano, abriendo un huevo del cual emergen insectos, peces, reptiles, pájaros y el hombre. En el huevo aparece la inscripción "*Ex ovo omnia*" que significa "todas

las criaturas provienen de un huevo", lo cual constituyó una gran predicción teniendo en cuenta que aún no conocía la existencia del pequeño ovocito de los mamíferos. Tal como lo describe Gwatkin en la compilación mencionada, el conocimiento acerca de los ovocitos de vertebrados aumentó posteriormente gracias a Malpighi (1673), quien realizó grandes avances en el estudio sobre el desarrollo de los huevos de pollo. Sin embargo, Malpighi clamaba haber visto un embrión dentro del ovocito no fertilizado, lo cual generó la teoría errónea de la *preformación*. Tras el descubrimiento de los espermatozoides de mamíferos, realizado por Leeuwenhoek seis años más tarde, se generó la idea de que el espermatozoide, y no el ovocito, contenía al *homunculus*, u organismo preformado. Por lo tanto surgieron dos escuelas de pensamiento, los *espermistas* quienes sostenían que los testículos de Adán deberían haber contenido a toda la humanidad, y los *ovistas* quienes sostenían lo mismo para los ovarios de Eva.

El concepto del desarrollo de estructuras completamente nuevas a partir de tejidos indiferenciados (epigénesis), el cual se contraponía a la teoría de la preformación, surgió en el siglo XVIII con los estudios realizados por Caspar Wolff (1759) en vegetales.

En ese entonces no se conocía verdaderamente al ovocito de los mamíferos, y se consideraba natural que poseyera un tamaño similar al de los grandes ovocitos de todos los otros vertebrados. De Graaf (1672), fue uno de los primeros en indicar el origen ovárico de los ovocitos. Sin embargo, al describir el desarrollo folicular consideró al folículo entero como la gameta femenina de los mamíferos y, así como sus seguidores, no pudo explicar cómo se producía el pasaje a través de las trompas de

Fallopio, las cuales resultaban muy pequeñas para albergar a lo que él consideraba un ovocito (Austin, 1960). Fué Von Baer (1827) quien, examinando ovarios humanos definió precisamente la estructura del folículo y la disposición del ovocito en su interior.

La primera observación de un espermatozoide dentro del espacio perivitelino de un ovocito fue realizada en el conejo por Barry en 1843. Posteriormente, fueron Van Beneden y Hertwig (1876) los responsables de los más significativos avances de la época. Estos investigadores demostraron la formación de un pronúcleo como resultado de la entrada del espermatozoide, y su posterior unión con el pronúcleo del ovocito. La inmensa significancia de estas observaciones fue comprendida rápidamente, y fué durante los 20 años que se sucedieron a aquel descubrimiento, que el concepto general de fertilización tal cual es utilizado hoy en día, fue establecido (Austin & Walton, 1960).

A partir de estas primeras observaciones, y con el mejoramiento de las técnicas histológicas se fueron registrando las características morfológicas de las distintas etapas del proceso de fertilización de mamíferos. Desde épocas tempranas, fueron varios los autores que intentaron lograr bajo condiciones *in vitro*, el proceso de fertilización (Shenk, 1878; Long, 1912). Sin embargo, por primera vez en 1959, Chang reportó el primer nacimiento de mamíferos a partir de ovocitos fertilizados *in vitro*. En este trabajo pionero, los espermatozoides habían sido previamente incubados en el tracto genital femenino, para ser posteriormente utilizados en la fertilización de ovocitos *in vitro*. Posteriormente les correspondió a Yanagimachi y Chang (1963) desarrollar por primera vez una técnica que permitió la ocurrencia del proceso de fertilización completamente bajo

condiciones *in vitro*.

Finalmente, en 1978, luego de un período de aproximadamente diez años de trabajo dedicado a la adaptación al humano de todas las técnicas disponibles para el manejo de gametas y transferencia de cigotas de otras especies, los médicos Bob Edwards y Patrick Steptoe (1978) informaron el nacimiento del primer bebé humano producido a partir de una fertilización *in vitro*, la niña Louis Brown.

I.1. Las Células Germinales

I.1.1. Origen en el desarrollo embrionario.

La reproducción en mamíferos es un proceso sumamente complejo con sistemas propios de eventos fisiológicos y comportamentales, pero en última instancia, todo depende de la unión de células germinales especializadas, *las gametas* femenina y masculina. En el momento de la unión, ambas gametas son haploides en el número cromosómico y en el contenido de ADN, estado que surge como consecuencia del proceso meiótico. Antes de la meiosis, las células germinales existen como células diploides, las cuales pueden ser localizadas en estadios embrionarios muy tempranos, previos al desarrollo gonadal (Byskov, 1982). A estas células germinales diploides se las denominan *células germinales primordiales* (CGP) y se caracterizan por su gran tamaño y gran contenido de la enzima fosfatasa alcalina. Desde el sitio original de localización, las mismas son transferidas en forma pasiva al epitelio del tubo digestivo primitivo, y luego, por

movimientos ameboides llegan al sitio de desarrollo gonadal. Durante este trayecto las CGP mantienen una alta actividad mitótica, ya que de sólo 15 - 100 localizadas originalmente en el ratón, se encuentran más de 20000 en el momento de la colonización de las crestas gonadales. Es importante recalcar que las CGP son la única fuente de células germinales en el adulto, y que tanto su origen como su migración hacia las crestas genitales (esbozos gonadales) son independientes del sexo del embrión.

Tras llegar a las crestas genitales, estas células se ubican en el epitelio de las mismas. En las gónadas indiferenciadas, las células somáticas y germinales se distribuyen en todo el tejido. A partir de cierta etapa del desarrollo embrionario, el sexo del embrión se hace morfológicamente distinguible, reflejándose primeramente en la morfología gonadal. Si el embrión es masculino, cordones celulares comienzan a desarrollarse desde la parte central hacia la periferia, rodeando a las células germinales que se diferencian en las *espermatogonias*, las cuales a través de la meiosis darán origen a los *espermatozoides*, las gametas masculinas. Este proceso se denomina *espermatogénesis*. En los embriones femeninos, las células germinales diferenciadas en *oogonias* no permanecen confinadas en cordones celulares. Las oogonias a su vez sufrirán un proceso meiótico, la *ovogénesis*, para dar origen a las gametas femeninas, los *ovocitos*.

I.1.2. Ciclo de vida de las células germinales.

El ciclo de vida de las células germinales es diferente según se trate del sexo femenino o masculino (Fig. I.1). En los machos, las divisiones meióticas que darán lugar a la aparición de los

espermatozoides, no comienzan hasta un período cercano al comienzo de la pubertad. Una vez desencadenada la meiosis, la producción de espermatozoides se produce en forma ininterrumpida durante toda la vida del organismo. En consecuencia, la cantidad de células germinales producidas durante la vida adulta del macho es ilimitada.

Por el contrario, en las hembras, la meiosis comienza muy temprano, generalmente durante la vida embrionaria, o en algunas especies como el hamster, conejo, gato y visón (Siracusa et al., 1985), alrededor del nacimiento.

A diferencia de lo que ocurre en los machos, la profase solo continúa hasta el período de diplotene, luego de lo cual sufre un arresto que se mantiene durante toda la etapa prepuberal de la vida del organismo (Fig. I.2). Los ovocitos comienzan entonces una prolongada etapa de arresto meiótico, la cual ha sido erróneamente llamada de "reposo", ya que es durante esta etapa que se produce una enorme actividad metabólica y sintética (Wassarman, 1983), la cual trae como consecuencia, por un lado, un crecimiento del ovocito del orden de aproximadamente 300 veces su volumen, y por el otro, la acumulación de compuestos que se utilizarán durante la fertilización y desarrollo embrionario previo a la implantación .

Como consecuencia del establecimiento del balance hormonal que determina el advenimiento de la pubertad, y el inicio de los ciclos reproductivos, se produce el desarresto meiótico y la continuación de este proceso conjuntamente con la serie de cambios que culminan en la ovulación. A este proceso se lo denomina *maduración del ovocito*, el cual consiste en: ruptura del núcleo o vesícula germinal, condensación de cromosomas, formación

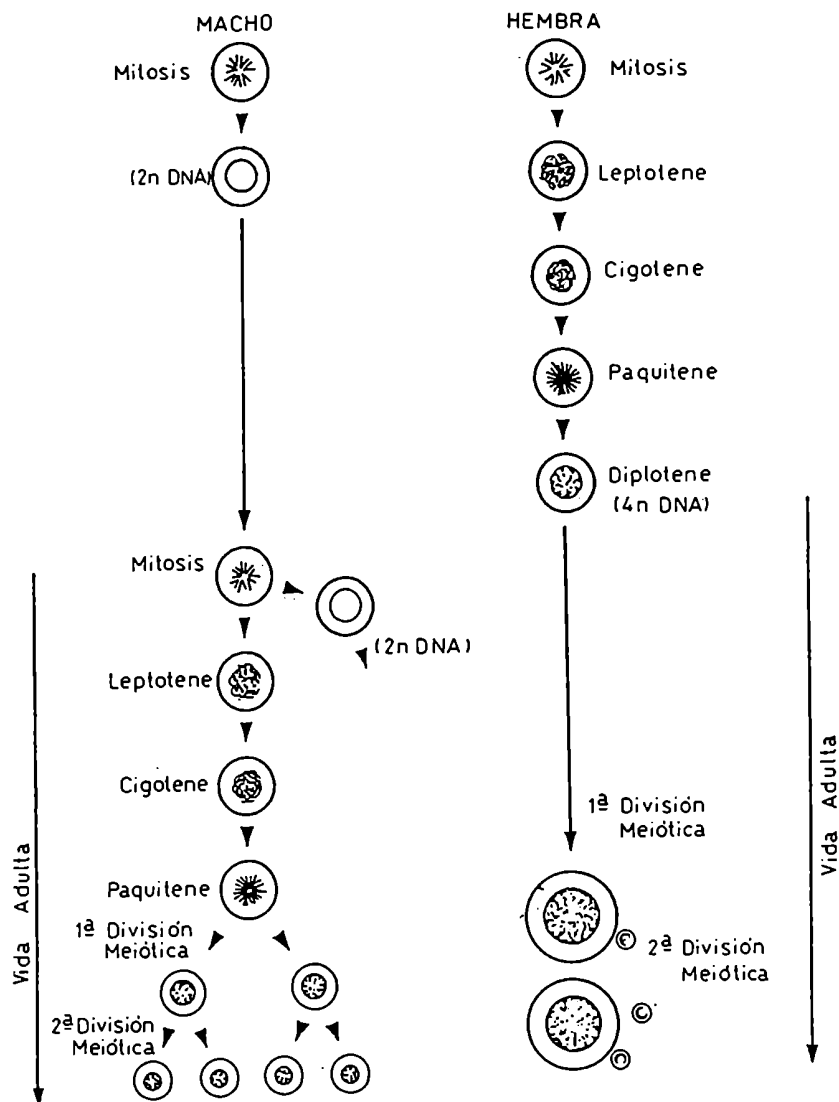


Fig. I.1. Ciclos de vida de las células germinales masculinas y femeninas. Las células germinales de ambos sexos se dividen mitóticamente hasta el momento cercano a la diferenciación sexual gonadal. A partir de este momento, durante la vida fetal, las células germinales femeninas entran en meiosis. Las células germinales masculinas mantienen una población celular que se divide mitóticamente, a partir de las cuales se generarán las células meióticas durante toda la vida adulta del organismo.

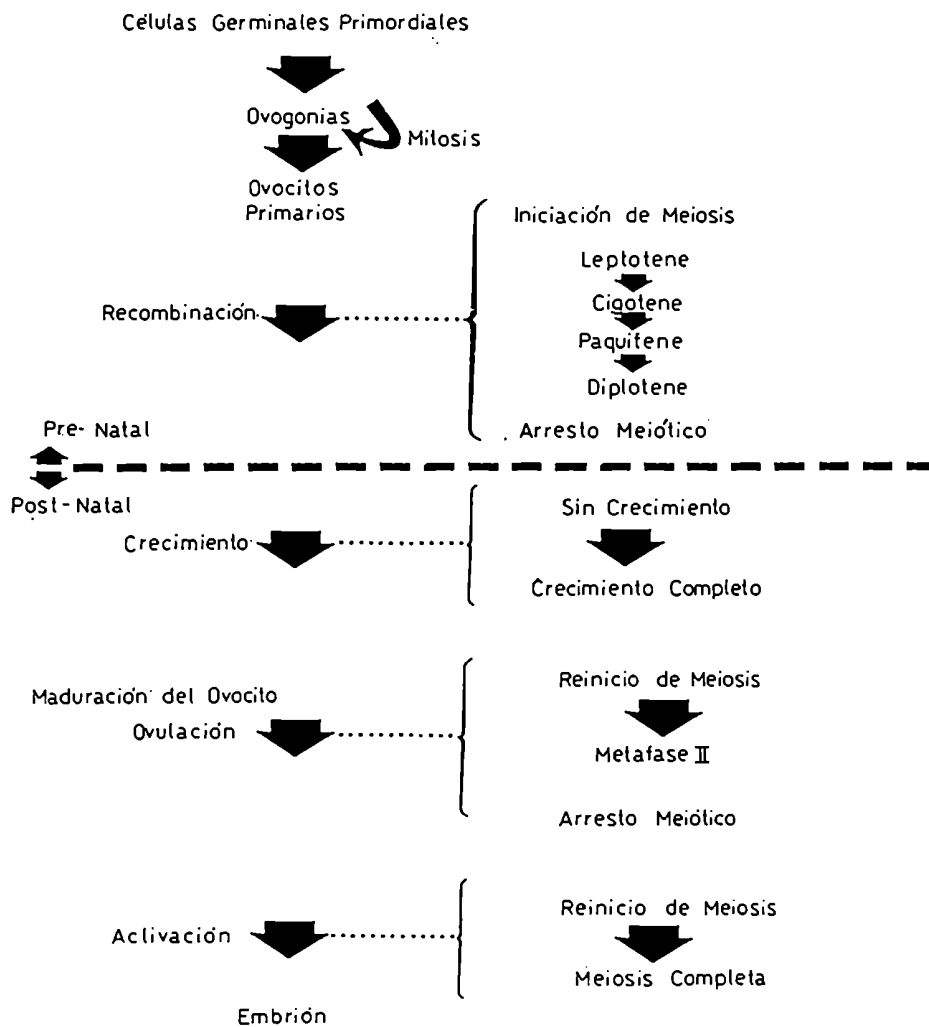


Fig. I.2. Ciclo de vida de las células germinales femeninas. Progresión, durante la vida fetal, desde las células germinales primordiales hasta los ovocitos arrestados en la profase I de la meiosis, y durante la vida adulta desde los ovocitos en profase I hasta los ovocitos fertilizados.

del huso correspondiente a la metafase I, emisión del primer cuerpo polar, y formación del huso correspondiente a la metafase II (Wassarman, 1988). En este estadio se produce la ovulación en la mayoría de los mamíferos. La progresión más allá de la metafase II (que implica la separación de las cromátides y emisión del segundo cuerpo polar), sólo ocurre si el ovocito es fertilizado (Fig. I.2).

Por lo tanto, en las hembras, las ovogonias poseen un tiempo de vida muy limitado, que no va más allá del período cercano al nacimiento, y por lo tanto, la producción de células germinales tiene un límite máximo, establecido en principio por la cantidad de divisiones mitóticas de ovogonias preexistentes. Si se tiene en cuenta que además, en el ovario se produce constantemente un importante fenómeno de atresia que produce la degeneración de los ovocitos, la cantidad de células germinales disponibles resulta muy limitada, sobretodo si se compara con la producción en el macho.

I.2. Descripción del ovocito y el espermatozoide

I.2.1. Estructura general del ovocito.

El esquema de un ovocito de mamíferos euterianos se muestra en la Fig. I.3. Si bien su tamaño es relativamente pequeño en comparación a los ovocitos de muchos grupos que no son mamíferos, el mismo resulta extraordinariamente grande en relación al tamaño de las células somáticas. El diámetro aproximado de un ovocito de mamífero es de 70 - 120 μm y no guarda relación alguna con el tamaño del animal adulto (Austin, 1961).

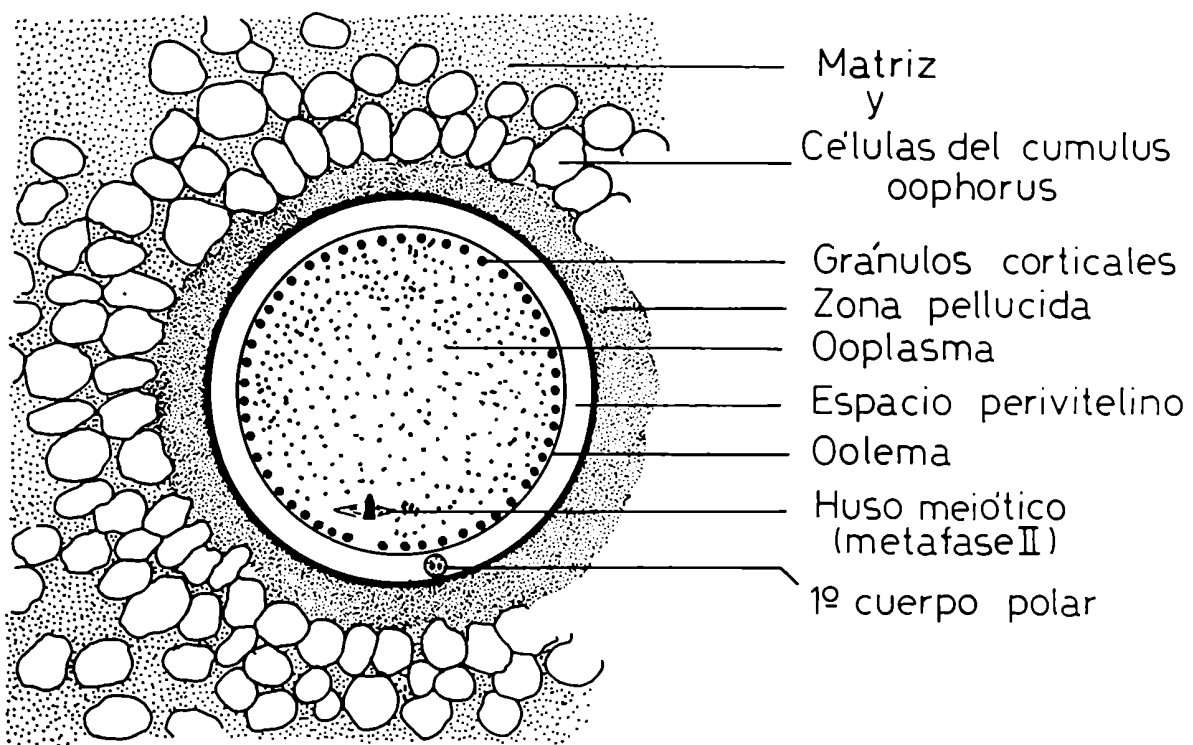


Fig. I.3. Diagrama correspondiente a un ovocito ovulado mamíferos euterianos.

El *ooplasma* (o citoplasma del ovocito) está rodeado por el *oolema* (o membrana plasmática del ovocito) y contiene, entre las organelas principales a las mitocondrias, el retículo endoplasmático, y el aparato de Golgi. Estas organelas contienen una batería de enzimas y se encuentran involucradas en importantes actividades metabólicas y sintéticas. Existe, a su vez, gran cantidad de ribosomas acumulados durante las etapas de crecimiento del ovocito. Este incremento en la cantidad de RNA ribosomal es consistente con un gran incremento en la síntesis de proteínas que se produce durante este período.

A partir del aparato de Golgi, durante la etapa de crecimiento del ovocito, se produce un aumento en la cantidad de vesículas y gránulos derivados del Golgi, lo cual es consistente con su actividad secretoria y su participación en la formación de *gránulos corticales*. Los gránulos corticales son organelas pequeñas, redondas, asociadas a la membrana plasmática, siendo los mismos considerados similares a los lisosomas ya que derivan del aparato de Golgi y contienen en su interior enzimas hidrolíticas y sacáridos (Schuel, 1985). Estas estructuras, descubiertas por primera vez en los mamíferos por Austin (1956), participan en la respuesta del ovocito a la entrada del espermatozoide, esencialmente como parte del mecanismo que previene la entrada de espermatozoides supernumerarios (ver sección I.9.2.).

Entre los componentes del citoesqueleto del ovocito se encuentran los microtúbulos, los cuales están involucrados en la formación del *huso meiótico*, el cual carece de centriolo (Austin, 1982). Cabe mencionar que, de acuerdo al momento del ciclo, el ovocito posee un núcleo organizado, o cromosomas condensados sin

membrana nuclear.

Existen también microfilamentos, los cuales se encuentran en la región cortical del citoplasma. Se cree que su función sería la de permitir la formación del cuerpo polar, o de facilitar la separación del citoplasma en dos partes iguales en etapas de clivaje (Austin, 1982).

Los componentes bioquímicos del citoplasma incluyen una gran cantidad de RNA, proteínas y glucógeno acumulado durante el crecimiento. El ovocito no fertilizado de ratón posee unos 40 pg de DNA (excluyendo el cuerpo polar), 500 pg de RNA, 20-25 ng de proteína, y 150 pg de glucógeno. A su vez, el citoplasma posee aproximadamente 100.000 mitocondrias, 100.000.000 de ribosomas y 4500 gránulos corticales. Cada ovocito posee 800 fmoles de ATP (una célula normal posee entre 15 y 25). Finalmente, existe una reserva importante de tubulina (\approx 250 pg) y de actina (\approx 100 pg) así como también cantidades enormes de gran variedad de enzimas involucradas en la síntesis de macromoléculas y metabolismo energético (Wassarman, 1988). Por lo tanto, el ovocito no fertilizado de mamíferos, posee una reserva muy importante de sustancias y componentes que serán movilizados a partir de la fertilización. Teniendo en cuenta que el mismo posee un volumen 60 - 70 veces mayor que una célula típica somática, la enorme acumulación de material podría atribuirse al crecimiento sin citocinesis que sufre la gameta.

El *oolema* (o membrana plasmática) del ovocito es esencialmente similar a la de otros tipos celulares. Posee microvellosidades en toda su superficie, exceptuando la región que cubre al huso meiótico. El potencial de reposo de la membrana del ovocito de ratón y hamster es de aproximadamente -40 y -30 mV

respectivamente (Miyazaki & Iguza, 1981; Jaffe et al., 1983).

Rodeando al ovocito se encuentra una capa extracelular denominada *zona pellucida*, la cual se forma durante la etapa de crecimiento, e incrementa su tamaño a medida que aumenta el tamaño del ovocito. La zona pellucida permanece aún luego de la fertilización, durante etapas del desarrollo embrionario, hasta el momento cercano a la implantación (Wassarman, 1983). La misma es permeable a macromoléculas grandes y pequeños virus y su composición consiste fundamentalmente en proteínas y carbohidratos, variando la proporción de cada uno de estos componentes según las especies. Entre los azúcares identificados se encuentran la manosa, fucosa, galactosa, N-acetilglucosamina y N-acetilgalactosamina. También fue detectada la presencia de ácido sialico en unión glicosídica y ésteres de sulfato y fosfato (Austin, 1982). La solubilidad de la zona en condiciones variables de pH, concentración iónica, temperatura, y en presencia de detergentes y urea, permitió establecer un modelo en el cual los componentes glicoproteicos se encuentran organizados como complejos supramoleculares unidos por fuerzas no covalentes (Wassarman, 1988). Distintas familias de glicoproteínas han sido identificadas como componentes de las zonas de ovocitos de distintas especies. En el ratón (una de las especies en que la zona pellucida ha sido mayormente estudiada) se han identificado 3 glicoproteínas principales, ZP1, ZP2 y ZP3, con pesos moleculares respectivos de 200.000, 120.000 y 83.000 (Bleil & Wassarman, 1980a). En el cerdo se identificaron cuatro familias de proteínas, ZP1-4 con pesos moleculares entre 82.000 y 21.000, y en el hamster se han identificado tres (ZP1-3), con pesos moleculares entre 240.000 y 80.000 (Yanagimachi, 1988a).

La zona pellucida contiene receptores que median la interacción con el espermatozoide, habiendo sido la ZP3 del ratón caracterizada como uno de estos receptores (Bleil & Wassarman, 1980b, 1986). A su vez, la zona pellucida participa junto a los gránulos corticales en uno de los mecanismos de prevención de la poliespermia.

Entre la zona pellucida y la membrana plasmática del ovocito se encuentra un espacio lleno de fluido, el *espacio perivitelino*. En la etapa previa a la ocurrencia de la primera división meiótica este espacio es virtual, pero con la emisión de cada cuerpo polar se libera fluido que llena este espacio. En el espacio perivitelino se encuentran los denominados *cuerpos polares*, provenientes de las divisiones meióticas. En aquellas especies en las cuales el ovocito se ovula en el estadio de metafase II, sólo se encuentra un cuerpo polar. El segundo no es liberado hasta después de producirse la fertilización. Sin embargo, en ciertos casos, el primer cuerpo polar se puede dividir, desaparecer en forma temprana (rata) o permanecer sin dividirse (conejo, hamster) (Austin, 1982). En ocasiones, como consecuencia de un fenómeno de activación espontánea, puede producirse la emisión del segundo cuerpo polar sin haber sido fertilizado el ovocito (Austin, 1982).

Rodeando al ovocito con su zona pellucida se encuentra un grupo de células de origen folicular (derivadas de las células de la granulosa) dispuestas en capas, las cuales en conjunto forman el *cumulus oophorus*. Durante la etapa de crecimiento folicular, el ovocito se nutre principalmente a través de las células del cumulus. En el folículo, estas células emiten procesos

citoplasmáticos que atraviesan la zona pellucida llegando hasta la membrana del ovocito y establecen canales de comunicación (uniones "gap"), a través de los cuales se produciría el pasaje de metabolitos (Anderson & Albertini, 1976; Gilula et al., 1978). En el momento de la ovulación estas uniones desaparecen (Larsen et al., 1986) y las células del cumulus comienzan a secretar ácido hialurónico produciéndose un fenómeno de expansión ó mucificación del cúmulus (Eppig, 1982). Dado que, aunque sin uniones intercelulares, el cumulus persiste aún luego de la fertilización en la mayoría de los mamíferos, se cree que el mismo tendría una función en la etapa post-ovulatoria distinta a la función nutricia de la etapa pre-ovulatoria. Una posible función sería la de permitir una eficaz captura del ovocito por parte de las trompas o, tal vez, debido a la disposición radial de las células, la de guiar al espermatozoide hacia el ovocito (Austin, 1982). Cabe mencionar que, en un trabajo reciente se demostró que el fluido folicular proveniente de folículos humanos provocaba la acumulación de espermatozoides humanos *in vitro*, y que esta acumulación se correlacionaba con la penetrabilidad del ovocito del cual provenía el fluido (Ralt et al., 1991). Los autores sugirieron que el/los factor/es causante/s de la acumulación de los espermatozoides podrían originarse en las células del cumulus o de la granulosa. Si las células del cumulus sintetizaran un factor de esta naturaleza, una tercera función para el mismo sería la de provocar la atracción de los espermatozoides hacia el ovocito en el momento de la ovulación.

Como ha sido mencionado, el ovocito de mamíferos resulta similar con el de los no-mamíferos en cuanto a que posee una reserva de macromoléculas y organelas que serán utilizadas a

partir de la fertilización. A pesar de que el clivaje de embriones de mamíferos es extremadamente lento en comparación al de los anfibios y equinodermos, la masa de proteínas sintetizadas *de novo* durante el período de clivaje es sumamente pequeña en comparación a la cantidad aportada por el ovocito no fertilizado. A su vez, resulta claro que ciertas estructuras y organelas (mitocondrias, gránulos corticales, zona pellucida) son sintetizadas durante la ovogénesis, para ser utilizadas durante la fertilización y embriogénesis temprana. Así también, la gran cantidad de ribosomas e histonas heredados por el embrión serían utilizadas durante las primeras divisiones mitóticas del desarrollo. Por lo tanto, la ovogénesis posee varios objetivos: un aumento en variación genotípica, la producción de una célula haploide, la biogénesis de macromoléculas y organelas involucradas en la fertilización, y la formación de una reserva de materiales que permitirían y regularían el desarrollo del embrión durante la etapa previa a la implantación. En todos estos aspectos, los ovocitos de mamíferos se asemejan a los de los no-mamíferos.

El período posterior a la ovulación durante el cual el ovocito es capaz de fusionarse con un espermatozoide y dar origen a un embrión normal, es lo que se conoce con el nombre de *vida fértil*. En forma generalizada, los ovocitos permanecen fértiles por un período de 24 hs luego de la ovulación (vaca, oveja, cerdo, hombre), o en algunos casos este período no sobrepasa las 12 hs post-ovulatorias (conejo, rata, hamster, ratón) (Austin, 1974). Si el período entre la ovulación y la fertilización es mayor que la vida fértil del ovocito, el desarrollo embrionario puede iniciarse, pero generalmente resulta anormal y de duración limitada (Austin, 1982).

I.2.2. Estructura general del espermatozoide

Como ha sido mencionado, el espermatozoide es el producto final de la meiosis en el macho, la cual ocurre dentro de los túbulos seminíferos, en el testículo.

Tal como fuera mencionado al inicio de este trabajo, los espermatozoides fueron descritos por primera vez en el semen y en el testículo hace unos 300 años por Van Leeuwenhoek, quien los llamó "animalculos". Durante muchos años se debatió acerca del papel desempeñado por los espermatozoides en la concepción de un nuevo organismo, hasta que finalmente, alrededor de 1830 se acordó que los espermatozoides constituían una parte del semen esencial para la fertilidad (Setchell, 1982).

Los espermatozoides de las distintas especies varían mucho con respecto al tamaño. Los del hombre, conejo y la mayoría de los animales domésticos miden alrededor de 50 μm de largo, mientras que los de los roedores son mucho más largos, midiendo entre 150 y 250 μm (Sechtell, 1982).

La Fig. I.4 muestra un esquema de las estructuras de un espermatozoide típico de mamíferos. Típicamente, la gameta masculina de todos los mamíferos, posee dos componentes principales: la *cabeza* y el *flagelo* (ó cola). A pesar de que estas dos estructuras están presentes en todos los mamíferos, existen diferencias especie-específicas en el tamaño y forma

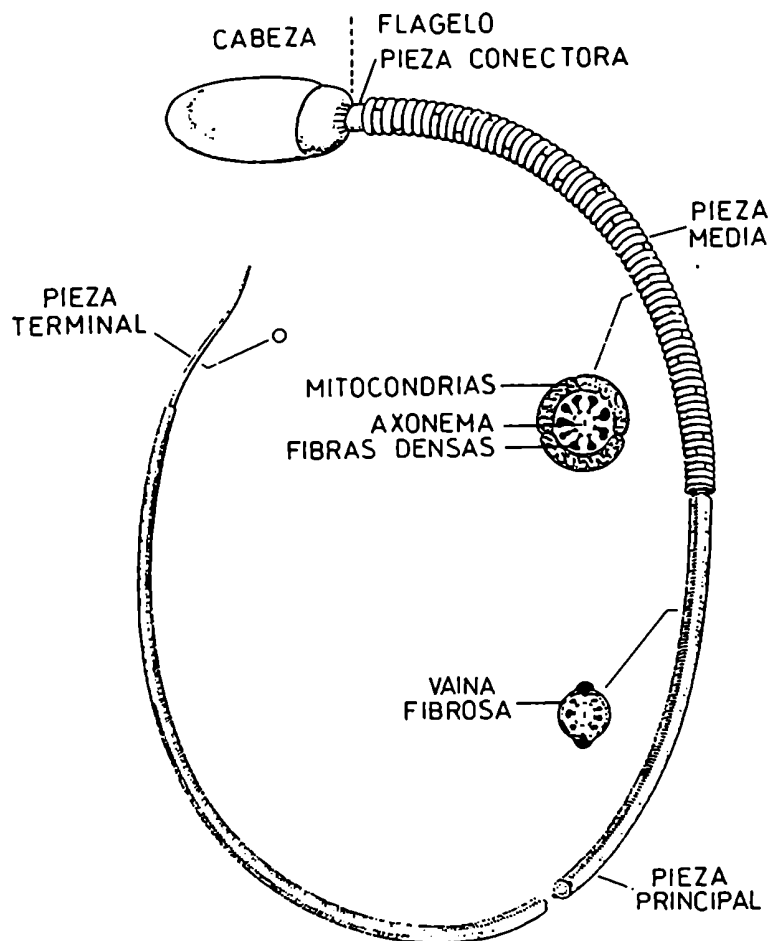


Fig. I.4. Esquema de un espermatozoide típico de mamífero.

tanto de la cabeza como de la cola.

Cada uno de estos componentes posee una actividad funcional diferente. La cabeza contiene al *núcleo*, y por lo tanto es la encargada de contener el material genético y, a su vez, contiene una estructura denominada *acrosoma* que posee las enzimas necesarias para atravesar las envolturas que rodean al ovocito y fertilizarlo. La cola, por su parte, contiene la maquinaria y fuentes energéticas necesarias para otorgarle motilidad al espermatozoide.

a) *Estructura de la cabeza:*

La Fig. I.5 muestra un diagrama de un corte sagital de la cabeza de un espermatozoide típico de mamífero.

La cabeza está ocupada principalmente por las dos estructuras mencionadas: el *núcleo* y el *acrosoma*. Existen también pequeñas cantidades de citoplasma y componentes del citoesqueleto, encontrándose éstos últimos en el pequeño espacio entre el *acrosoma* y el *núcleo* y por debajo de la membrana plasmática.

El *núcleo* consiste en una masa altamente condensada de ADN en asociación con proteínas pequeñas, altamente básicas, ricas en cisteínas y argininas, denominadas "protaminas" (Bellvé & O'Brien, 1983). Estas protaminas son producto de expresión del genoma haploide, ya que el ARNm codificante para las mismas se sintetiza en las espermatidas (Hecht et al., 1986). El complejo altamente condensado ADN-protaminas, se encuentra estabilizado por la presencia de puentes disulfuro entre las protaminas (Setchell, 1982). Las proteínas cromosomales no-protamínicas se

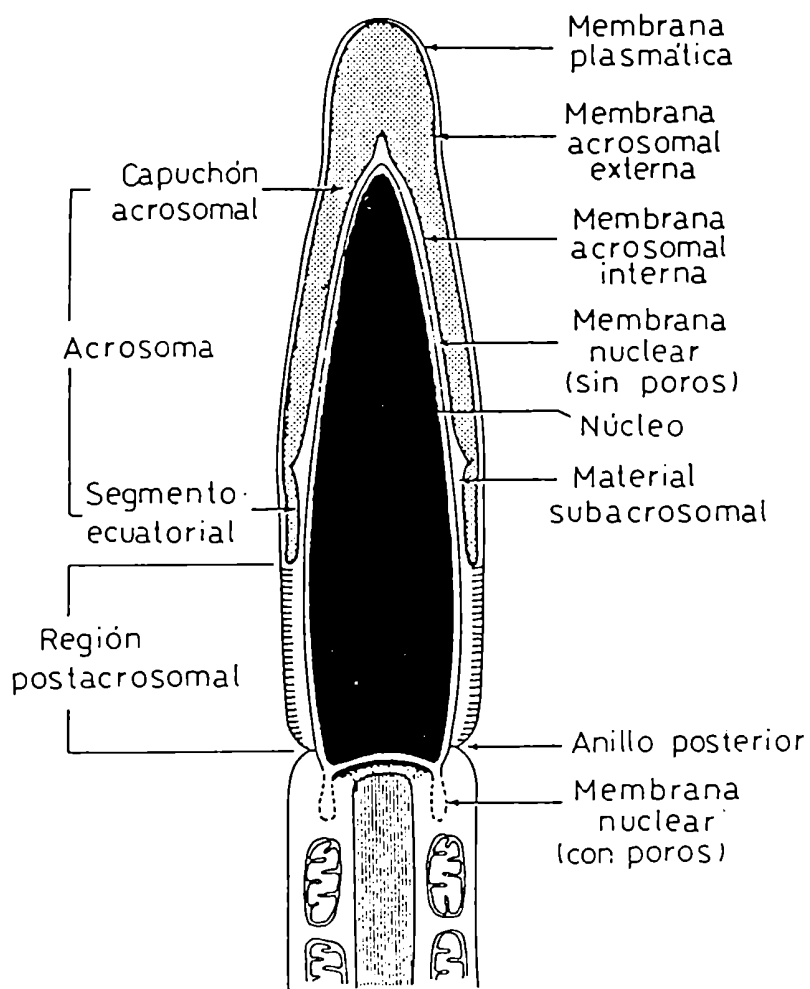


Fig. I.5. Diagrama de un corte sagital de la cabeza de un espermatozoide de mamífero.

encuentran en cantidades muy pequeñas incluyéndose entre las mismas, componentes estructurales del núcleo, como por ejemplo histonas residuales, o enzimas como las ADN y ARN-polimerasas y proteasas asociadas a la cromatina (Bellvé & O'Brien, 1983).

El núcleo del espermatozoide está rodeado por una *membrana nuclear* atípica. La mayor parte de la misma carece de poros nucleares, y la distancia entre las dos membranas que la forman es mucho más pequeña que la existente en las células somáticas. Sin embargo, en la región más caudal existen gran cantidad de poros y la distancia entre ambas membranas es similar a la existente en otros tipos celulares (Friend & Fawcett, 1974).

El *acrosoma* del espermatozoide se origina a partir del aparato de Golgi en la espermátida, y consiste en una estructura rodeada de membrana que contiene enzimas que se creen necesarias para lograr la penetración del ovocito (este punto se discutirá mas adelante). Existe una gran variación del acrosoma, tanto en forma como en tamaño, entre las distintas especies (Yanagimachi, 1981). En la mayoría de las especies, el acrosoma se localiza en el extremo anterior de la cabeza inmediatamente por debajo de la membrana plasmática. En su región posterior se inserta profundamente el núcleo, de modo que la membrana acrosomal queda dispuesta en dos partes: una parte situada inmediatamente por debajo de la membrana plasmática, *membrana acrosomal externa* y otra rodeando a la región anterior de la membrana nuclear, *membrana acrosomal interna*. Entre ambas se encuentra el contenido acrosomal. Si bien tanto la membrana acrosomal externa como la interna forman parte de una única membrana acrosomal, ambas poseen características diferentes, las cuales serían producto de una diferenciación posterior a la formación del acrosoma durante

la espermiogénesis. Por ejemplo, la membrana acrosomal interna del ratón y conejo resulta, a diferencia de la externa, sumamente resistente a la disrupción química y física, incluyendo tratamientos con detergentes no-iónicos y sonicación (Rahi et al., 1983; Huang & Yanagimachi, 1985).

El acrosoma se divide en dos segmentos: el *capuchón acrosomal* (también llamado acrosoma anterior) y el *segmento ecuatorial* (o acrosoma posterior). Como ha sido mencionado, existen diferencias especie-específicas en la forma de la cabeza. En la mayoría de las especies (ej. humano, conejo, cobayo, toro), la cabeza de los espermatozoides posee forma espatulada mientras que los roedores poseen en general, formas falciformes. La distribución y tamaño relativo del capuchón acrosomal y segmento ecuatorial varían según las especies (Yanagimachi, 1981). En la Fig. I.6 se esquematizan las cabezas de espermatozoides provenientes de seis especies diferentes, entre las cuales se encuentran tanto formas espatuladas como falciformes, pudiéndose observar las diferencias en la distribución y tamaño relativo de las partes que componen el acrosoma. El término "segmento ecuatorial" resulta apropiado para espermatozoides cuyas cabezas poseen formas espatuladas, como en el caso de espermatozoides humanos o de conejo ya que, en estos casos, la región mencionada se encuentra formando una banda sobre el área ecuatorial de la cabeza. Sin embargo, en espermatozoides con cabezas falciformes, como en el caso de la rata o el ratón, el segmento ecuatorial cubre la mayor parte de la superficie lateral de la cabeza, (Phillips, 1977a; Yanagimachi, 1981) (Fig. I.7).

El acrosoma ha sido descrito como un lisosoma especializado ya que contiene enzimas encontradas típicamente en lisosomas

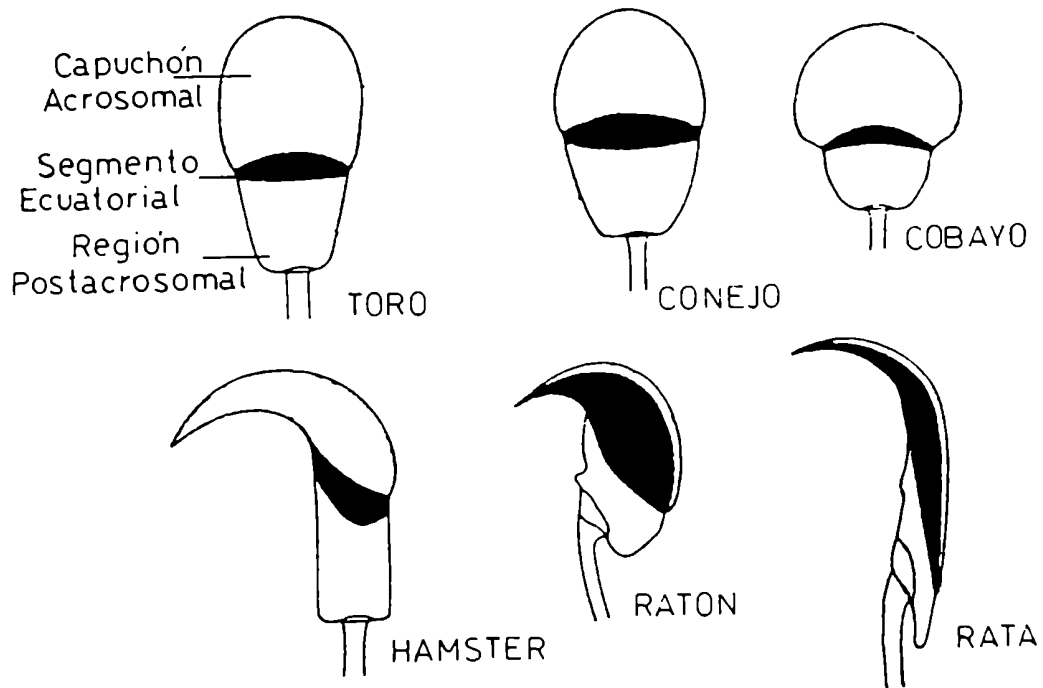


Fig. I.6. Diagramas ilustrando el tamaño relativo y relación topográfica entre el capuchón acrosomal y el segmento ecuatorial de los espermatozoides provenientes de seis especies diferentes.

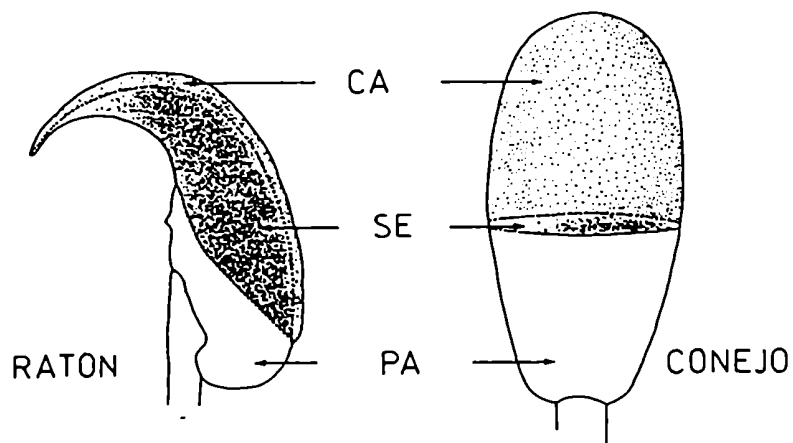


Fig. I.7. Diagramas correspondientes a la cabeza de un espermatozoide de ratón (falciforme) y de un espermatozoide de conejo (espatulada). (CA) capuchón acrosomal, (SE) segmento ecuatorial, (PA) región postacrosomal. El capuchón acrosomal es más extenso en los espermatozoides con cabeza espatulada, mientras que la región del segmento ecuatorial es mayor en los espermatozoides con cabeza falciforme.

primarios (Allison & Hartree, 1970; Hartree, 1975), aunque aparentemente no posee la función lisosomal de digerir desechos citoplasmáticos o material que entra a la célula. A su vez, contiene enzimas exclusivas del espermatozoide, que son la *hialuronidasa* y la *acrosina*, ambas como componentes mayoritarios. La acrosina es una proteasa de serina similar a la tripsina, pero difiere de enzimas del mismo tipo presente en otras células en su peso molecular y especificidades de substrato e inhibidores, lo cual indicaría que se trata de una isozima específica de células espermáticas (Müller-Esterl & Fritz, 1981). La hialuronidasa presente en el espermatozoide es distinta de la lisosomal, y así como la acrosina sería también una isozima específica de células espermáticas (Goldberg, 1977). La presencia de ambas enzimas (acrosina y hialuronidasa) en la matriz acrosomal ha sido fehacientemente demostrada por estudios citoquímicos, inmunocitoquímicos y de microscopía electrónica (Yanagimachi, 1988a) y estudios recientes sugerirían que la acrosina se localizaría también en la membrana acrosomal interna de los espermatozoides de hamster (Capote et al., 1989).

b) *Estructura del flagelo:*

Como se ha mencionado previamente, el flagelo (ó cola) del espermatozoide, provee la motilidad necesaria para que la gameta masculina llegue hasta la superficie del ovocito y lo fertilice. Los distintos elementos de la cola están involucrados en:

- i) generar el movimiento ondulatorio que provoca la motilidad,

ii) propagar las ondas desde la base hasta la punta de la cola.

Los segmentos que componen el flagelo son cuatro: la *pieza conectora* o cuello, la *pieza media*, la *pieza principal* y la *pieza terminal* (Fig. I.4). La pieza conectora une el aparato motriz de la cola al núcleo. En el centro de la cola, desde la pieza conectora hasta la punta, se encuentra el *axonema*, o complejo del filamento axial, el cual posee la misma organización que las cilias y flagelos presentes en células animales y vegetales. El mismo consiste de dos microtúbulos centrales rodeados de nueve pares de microtúbulos periféricos (Linck, 1979). Rodeando al axonema se encuentran nueve *fibras densas*, cada una de las cuales corre paralela a uno de los nueve pares de microtúbulos periféricos. En toda la pieza media, rodeando en forma de hélice a las fibras densas, se disponen las *mitocondrias*. El número de hélices y giros que forman las mitocondrias, así como el largo de la pieza media varían entre especies (Phillips, 1977b). La pieza principal se caracteriza por ser el segmento más largo del flagelo. Esta región no contiene mitocondrias y posee en cambio una estructura de naturaleza proteica denominada *vaina fibrosa*, la cual se dispone inmediatamente por debajo de la membrana plasmática, rodeando al axonema y fibras densas. Esta estructura se encuentra únicamente en espermatozoides de mamíferos y algunos pájaros (Eddy, 1988), y se extiende hasta el comienzo de la pieza terminal. Por su parte, la pieza terminal sólo consiste en los microtúbulos del axonema, rodeados únicamente por la membrana plasmática.

c) *La membrana plasmática:*

- Composición.

Utilizando membranas de espermatozoides purificadas, fue posible determinar que la membrana de los espermatozoides está compuesta en un 70% por lípidos, siendo los más abundantes la fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, esfingomiélinea, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, y lisofosfatidilcolina. Siguen en abundancia los esteroides con una relación molar colesterol/fosfolípido de aproximadamente 0.12. Los glicolípidos son menos abundantes, siendo el sulfogalactosilacilglicerol el componente fundamental de este grupo. Los diacilglicérols se encuentran en una proporción similar a los glicolípidos y, finalmente, los ácidos grasos libres son los componentes lipídicos que se encuentran en menor proporción (Nikolopoulou et al., 1985). Las cantidades de lípidos y proteínas totales son aproximadamente las mismas teniendo en cuenta a la totalidad de la membrana plasmática (Nikolopoulou et al., 1985). Sin embargo, la cantidad y tipo de lípidos, así como la relación lípido/proteína probablemente varíen entre las distintas regiones del espermatozoide (Friend, 1982).

- Dominios de superficie.

Una característica única de los espermatozoides es que la membrana plasmática se encuentra subdividida en dominios regionales de límites claramente definidos, que difieren tanto en composición como en función. Estas diferencias de organización y composición entre regiones (evidenciadas originalmente a través

de estudios de cargas de superficie, unión de lectinas, congelamiento-ruptura y marcación con anticuerpos) permitieron establecer el concepto, actualmente en vigencia, de la membrana plasmática como un mosaico de dominios restringidos que reflejan funciones especializadas de los componentes citoplasmáticos y de superficie del espermatozoide (Eddy, 1988).

Los dominios principales de la región de la membrana plasmática de la cabeza son: a) el acrosoma anterior y el segmento ecuatorial, ambos cubriendo las regiones correspondientes del acrosoma, y b) la región postacrosomal cubriendo la región de la cabeza posterior al acrosoma. El anillo posterior, situado entre la cabeza y la cola, formaría un sello entre los compartimientos citoplasmáticos de estas dos regiones (Eddy, 1988). La membrana de la cola se divide en los dominios correspondientes a la pieza media y cola posterior.

- Heterogeneidad en composición entre los dominios.

Los primeros estudios que demostraron la heterogeneidad de la membrana plasmática fueron aquellos en los que se estudiaron las diferencias regionales en la carga de superficie. Es así que se demostró mediante el comportamiento de los espermatozoides en un campo electroforético (Bangham, 1961; Nevo et al., 1961), o mediante microscopía electrónica de células marcadas con hierro coloidal (Yanagimachi et al., 1972), que la cola posee mayor densidad de cargas negativas que la cabeza. Estudios de aglutinación inducida por lectinas (Kashiwahara et al., 1965; Nicolson & Yanagimachi, 1972) así como de marcación por lectinas iodinadas (Nicolson et al., 1972; Koehler, 1981), acopladas a

marcadores fluorescentes (Edelman & Milette, 1971; Milette, 1977) o ultraestructurales (Nicolson & Yanagimachi, 1974), revelaron diferencias regionales en la localización y cantidad de sacáridos específicos en la superficie del espermatozoide. Mediante técnicas de congelamiento-fractura y réplicas de superficie se ha podido demostrar también la existencia de diferencias en el número y distribución de partículas intramembranas y de estructuras asociadas a membrana entre las distintas regiones del espermatozoide (Friend & Fawcett, 1974; Suzuki & Nagano, 1980; Suzuki, 1981). A su vez, la combinación de técnicas de congelamiento-fractura con agentes intercalantes de membrana se ha utilizado también para evidenciar la heterogeneidad en componentes lipídicos y esteroides (Friend, 1982).

Finalmente, el empleo de anticuerpos policlonales y monoclonales dirigidos contra espermatozoides, células germinales, otros tipos celulares o moléculas aisladas, han permitido realizar los mayores avances en la identificación y caracterización de los dominios de superficie. Es así que se han identificado antígenos compartidos con otros tipos celulares (antígeno H-Y, Koo et al., 1973; antígeno embrionario F9, Fellous et al., 1974; galactosiltransferasa, López et al., 1985) o específicos de células espermáticas (Tung & Fritz, 1978; Feutcher et al., 1981; Primakoff & Myles, 1983; Gaunt et al., 1983; Villarroja & Scholler 1986) los cuales se encuentran restringidos a dominios únicos o bien son compartidos por más de un dominio de la membrana plasmática.

- Formación de los dominios de superficie.

Si bien no se conocen los mecanismos responsables del

establecimiento de los dominios, resulta sumamente probable que la mayoría de los mismos se establezca durante la espermiogénesis, que es el proceso a través del cual la espermátida se remodela y forma un espermatozoide. En este sentido, los mismos mecanismos y procesos morfogénéticos responsables del establecimiento de la forma y organización del espermatozoide estarían involucrados en la formación de dominios. Entre ellos se incluye la participación del citoesqueleto (determinante de la forma) el cual se asociaría a través de proteínas intermediarias a proteínas transmembrana, las cuales, a su vez, definirían los límites y contenidos de los diferentes dominios (Eddy, 1988). Dado que se ha demostrado la presencia de actina en los distintos dominios de espermatozoides de distintas especies (Tamblin, 1980; Clarke et al., 1982; Welch & O'Rand, 1985) y de espectrina (una de las principales proteínas unidoras de actina), la cual generalmente se encuentra asociada a la cara citoplasmática de la membrana plasmática (Damjanov et al., 1986), ambas proteínas podrían encontrarse involucradas en la formación de dominios. A su vez, las células de Sertoli, a través de sus uniones especializadas con las espermátidas, podrían ayudar en la generación de la forma de la cabeza o en el mantenimiento de la polaridad necesaria para la formación de los dominios. Entre estas uniones se encuentran las "especializaciones ectoplasmáticas", las cuales consisten en manojos de actina que se insertan en las espermátidas y se mantienen hasta el momento de la liberación de los espermatozoides (Russel, 1980). Otro tipo de unión especializada lo constituyen los "complejos tubulobulbares", los cuales aparecen alrededor de la espermátida, a medida que las uniones ectoplasmáticas comienzan a disociarse.

Estos complejos son permanentemente fagocitados por las células de Sertoli y serían el mecanismo a través del cual se produce la eliminación del citoplasma espermático (Russel, 1979, 1980). Por lo tanto, este proceso tendría la capacidad de alterar en forma sustancial la composición y organización de la membrana plasmática pudiendo cumplir un papel en la determinación de la naturaleza y organización de los dominios.

- Mantenimiento de los dominios.

Entre las posibles causas del mantenimiento de los dominios de superficie se incluyen la restricción de movilidad de moléculas dentro del dominio en el cual se encuentran, la existencia de barreras en la membrana que impiden el movimiento de los componentes de superficie, y la partición termodinámica de componentes en regiones específicas (Myles et al., 1987). La restricción de movilidad podría ocurrir a través de la interacción de componentes intramembranosos con moléculas situadas dentro o fuera de la membrana. También resultaría determinante de límites entre dominios la existencia de restricciones internas formadas por componentes y estructuras citoplasmáticas. Tal es el caso de bandas oblicuas de partículas intramembranosas características de la cola que se encuentran asociadas a las mitocondrias subyacentes o de partículas transmembrana presentes en el flagelo que se mantienen dispuestas con forma de cremallera gracias a su asociación a componentes de la vaina fibrosa (Friend & Fawcett, 1974). Se ha descrito también la existencia de una "cresta" citoplasmática, entre el dominio correspondiente al capuchón acrosomal y al segmento

ecuatorial del acrosoma (Friend & Fawcett, 1974). Finalmente, podrían existir barreras dentro del plano de la membrana (Myles et al., 1987). El hecho de que un antígeno se encuentre impedido de difundir entre dominios no implica necesariamente que el mismo se vea impedido de difundir dentro del dominio en que se encuentra. Es así que, por ejemplo, el antígeno de cobayo PT-1 posee libre difusión en la región distal de la cola pero se encuentra prevenido de migrar hacia la pieza media (Myles et al., 1984). En la rata se han descrito dos antígenos presentes en toda la cola que muestran agrupamiento inducido por anticuerpo, pero sin que estos agrupamientos migren a la cabeza (Gaunt et al., 1983). Finalmente, cabe destacar que no todos los componentes de la membrana se encuentran restringidos en su migración entre dominios. Utilizando la técnica de recuperación de fluorescencia luego del blanqueo por luz ("photobleaching"), se observó un libre intercambio de un análogo lipídico por difusión lateral entre la membrana plasmática de la cabeza y la pieza media, y entre la pieza media y la región distal de la cola (Wolf & Voglmayr, 1984).

I.3. Maduración de los espermatozoides en el epidídimo

En la sección anterior, se ha descrito la estructura de un espermatozoide tal como es liberado de los túbulos seminíferos. Una vez liberados del epitelio seminífero en el testículo, los espermatozoides (que en este momento son prácticamente inmóviles) son transportados pasivamente por la corriente de fluido generada por las células de Sertoli a un reservorio ramificado denominado *rete testis*, en donde se abren ambos extremos de los túbulos

seminíferos. Desde la rete testis los espermatozoides son transportados hacia los *conductos eferentes*, los cuales se continúan con el *epidídimo* (Fig. I.8). En todo este trayecto el transporte de los espermatozoides se realiza en forma pasiva, ayudado en parte por la reabsorción de agua que se produce en los ductos eferentes, y en parte por los movimientos ciliares de las células que tapizan el epitelio de los mismos. El epidídimo es un conducto único, largo y muy replegado, que cubre el borde posterior del testículo, y se encuentra unido en su parte distal a la base del escroto por la ligadura genito-inguinal. Convencionalmente, el epidídimo se divide en tres regiones: *caput* (cabeza), *corpus* (cuerpo) y *cauda* (cola) (Fig. I.8), siendo a su vez divididas cada una de ellas en proximal y distal. No existen límites definidos entre estas regiones y la función e importancia relativa de cada una varía entre especies. En la región del *caput* se produce una gran absorción de fluido y por consiguiente la concentración de espermatozoides que atraviesan esta región aumenta unas veinte veces o más (Brooks, 1979). Más adelante, a lo largo del conducto epididimario, se absorben iones y secretan compuestos orgánicos, de modo que la naturaleza del medio cambia progresivamente.

Finalmente, existe una gran actividad secretoria de proteínas por parte del epitelio del epidídimo, la cual resulta en gran parte responsable de la composición única del plasma epididimario. La síntesis de proteínas de origen específicamente epididimario, siendo la mayoría de naturaleza andrógeno-dependiente, ha sido demostrada en varias especies mediante experimentos *in vivo* (Lea et al., 1978; Kohane et al., 1980a; Vernon et al., 1982; Poirier & Nicolson, 1984) e *in vitro* (Cameo

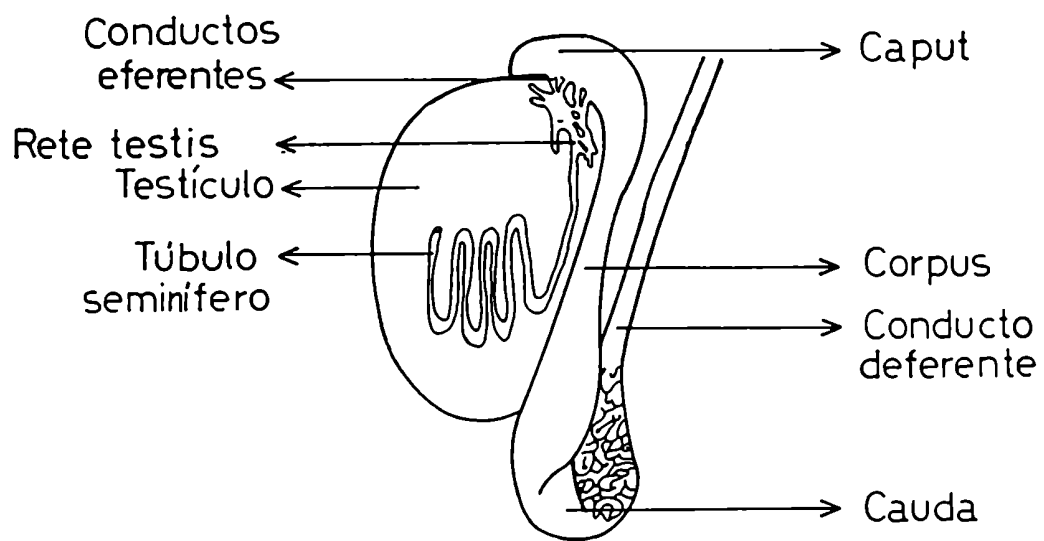


Fig. I.8. Esquema del epidídimo y su conexión con el testículo.

& Blaquier, 1976; Moore, 1980; Dacheaux, 1980; Brooks, 1981; Jones et al., 1982; González Echeverría et al., 1982; Tezón et al., 1985a). Estos mismos experimentos, permitieron evidenciar que, tanto la capacidad sintética como los productos proteicos, varían de una región epididimaria a otra.

I.3.1 Adquisición de capacidad fertilizante

En los mamíferos euterianos, los espermatozoides testiculares, no poseen aún capacidad de interactuar con un ovocito y fertilizarlo, a pesar de ser estructuralmente completos. Esta capacidad es adquirida durante su tránsito por el epidídimo y a este proceso se lo conoce con el nombre de *maduración epididimaria* (Bedford, 1979; Austin, 1985). Estrictamente hablando, como consecuencia del pasaje a través del epidídimo, los espermatozoides adquieren una "potencial" capacidad fertilizante ya que, como se describirá más adelante, luego de la maduración, los mismos deben sufrir un proceso de *capacitación* en el tracto genital femenino antes de penetrar al ovocito.

La existencia de un fenómeno de maduración funcional de los espermatozoides en el epidídimo fue puesto en evidencia por investigadores de la primera mitad de este siglo, como Young (1931), quien encontró que la inseminación de hembras cobayo en estro con espermatozoides provenientes de la región proximal del cauda epididimario resultaba en un 33% de fertilidad, mientras que si la misma era realizada con espermatozoides provenientes de la región distal del cauda se obtenía un 66%. Mayores evidencias a favor de esta hipótesis fueron provistas por estudios realizados en la rata por Blandau y Rumery (1964) quienes

encontraron que, mientras la inseminación artificial uterina con espermatozoides del cauda permitía obtener un 98% de fertilización, se lograba sólo un 8% utilizando espermatozoides del caput. Estos estudios fueron extendiéndose a la gran mayoría de las especies y, actualmente, se admite que la maduración epididimaria es un requisito indispensable para la adquisición de capacidad fertilizante en todas las especies de mamíferos estudiadas. La región epididimaria en la cual los espermatozoides adquieren capacidad fertilizante varía de especie en especie (Cooper, 1986). Es probable que la adquisición de capacidad fertilizante no ocurra en forma sincrónica en todos los espermatozoides dado que, algunos espermatozoides resultan fértiles en regiones más proximales que otros. Sin embargo, en forma general, en el momento de llegar a la región del cauda, la gran mayoría de los espermatozoides ha adquirido capacidad de fertilizar al ovocito.

Mediante estudios en los cuales se disponían ligaduras entre regiones del epidídimo, con la finalidad de evitar el tránsito de los espermatozoides a lo largo del mismo, fue posible estudiar si la simple permanencia en este órgano resultaba responsable de la adquisición de fertilidad (Orgebin-Crist, 1969). Estos trabajos demostraron que, por el contrario, es imprescindible el tránsito de los espermatozoides por el conducto epididimario para adquirir completa capacidad funcional.

La capacidad del epidídimo de mantener la viabilidad y permitir la maduración de los espermatozoides es de naturaleza andrógeno-dependiente. Tanto la hipofisectomía, como la castración o el tratamiento con anti-andrógenos, provocan la pérdida de capacidad fertilizante y muerte de los espermatozoides. A su vez, la

terapia de reemplazo con andrógenos luego de la castración, restaura ambos parámetros (Orgebin Crist et al., 1975).

I.3.2. Cambios estructurales y funcionales de los espermatozoides en el epidídimo.

a) Desarrollo de motilidad:

Uno de los cambios más prominentes que se producen durante la maduración de los espermatozoides es el desarrollo de motilidad. Los espermatozoides testiculares son prácticamente inmóviles. Esta inmotilidad existe tanto dentro de los túbulos seminíferos como cuando son suspendidos en soluciones salinas fisiológicas. Los espermatozoides maduros provenientes del cauda epididimario, en cambio, inician una motilidad activa y direccional cuando son liberados del fluido epididimario. Los espermatozoides provenientes de regiones más proximales bajo estas mismas condiciones, muestran patrones de motilidad no direccionales (Bedford, 1975). A pesar de que la capacidad de desarrollar motilidad progresiva, al ser suspendidos en un medio adecuado, ocurre durante la maduración, cuando los espermatozoides contenidos en el cauda son liberados por perfusión con aceite mineral y examinados bajo el microscopio, se observa que los espermatozoides contenidos en el fluido están completamente inmóviles. Esto indica que la motilidad *in situ*, dentro del epidídimo, se encuentra completamente suprimida. Si a estos espermatozoides se les agrega solución fisiológica, los mismos muestran rápidamente movimientos natatorios vigorosos y una motilidad rápida y progresiva (Gaddum, 1968). Así como había sido

demostrado para la adquisición de capacidad fertilizante, la simple permanencia en el epidídimo no sería suficiente para adquirir motilidad progresiva y direccional (Cooper, 1986). Los mecanismos responsables de la adquisición de motilidad por parte de los espermatozoides inmaduros se darían a nivel de la membrana plasmática, ya que se ha demostrado que espermatozoides inmaduros desmembrados, en presencia de ATP, AMPc y Mg^{2+} , adquieren patrones de motilidad similares a los encontrados entre espermatozoides maduros (Mohri & Yanagimachi, 1980; White et al., 1986). La transferencia de varias sustancias desde el fluido epididimario a los espermatozoides, tales como carnitina (Hinton et al., 1981), una proteína denominada de " motilidad progresiva" (Acott & Hoskins, 1981; Acott et al., 1983) y/o glicerofosforilcolina (Infante & Huszagh, 1985) resultaría importante para el desarrollo de motilidad.

b) *Cambios metabólicos:*

Una diferencia importante entre los espermatozoides del cauda y los del caput, es su contenido en coenzimas nucleotídicas. Por ejemplo, en el toro, se ha descrito que el nivel de AMPc presente en espermatozoides del cauda duplica el hallado entre los del caput (Hoskins et al., 1974,1975). Con el fin de clarificar los mecanismos de control de los niveles de AMPc, fueron determinadas las actividades de las enzimas adenilato ciclasa y fosfodiesterasa para espermatozoides provenientes de distintas regiones epididimarias, pudiendo ser establecido que ambas enzimas se encuentran en mayor cantidad en espermatozoides del caput que del cauda (Stephens et al., 1979; Casillas et al.,

1980). A pesar de esto, se sugirió que los niveles de AMPc estarían fundamentalmente controlados por la fosfodiesterasa, ya que si espermatozoides del caput se incubaban en presencia de un inhibidor de esta enzima, como lo es la teofilina (que tiende a preservar o aumentar los niveles de AMPc) se mejoraba notablemente la motilidad (Hoskins & Casillas, 1975). En el conejo, tratando a los espermatozoides testiculares con otro inhibidor de la fosfodiesterasa, la cafeína, Brackett (1978) obtuvo un porcentaje de fertilización de ovocitos *in vitro* cercano al 10%. Sin embargo, trabajos posteriores en la rata (Purvis et al., 1982) indicarían que el aumento de los niveles del nucleótido cíclico durante el tránsito epididimario estaría dado tanto por su mayor síntesis (activación de adenilato ciclasa) como por su menor hidrólisis (inhibición de fosfodiesterasa).

Otra serie de cambios metabólicos que ocurren durante el pasaje por el epidídimo lo constituyen el aumento de la tasa de glicólisis y la disminución en la incorporación de glucosa a glicéridos y glicerofosfátidos (Volgmayr, 1975; Turner et al., 1975). Por otro lado se ha demostrado, también en la rata, un incremento en la enzima carboximetilasa de proteínas, conjuntamente con una mayor cantidad de proteínas aceptoras de metilos (Purvis et al., 1982), lo cual estaría evidenciando un aumento en la metilación de proteínas durante el tránsito por el epidídimo. En relación a esto último, la enzima metil-esterasa (la cual hidroliza los metil-ésteres formados por la carboximetilasa) disminuye con la maduración, tanto en la rata como en el toro (Gagnon et al., 1984). Sin embargo, hasta el momento, la naturaleza y el papel desempeñado por las proteínas metiladas no es conocido.

c) *Cambios estructurales:*

Los cambios estructurales de los espermatozoides durante la maduración se dan tanto a nivel microscópico como submicroscópico. Dentro de la primera categoría se encuentra la pérdida de la gota citoplasmática (remanente del cuerpo residual citoplasmático de la espermatida), la cual se encuentra en la región de la pieza media en el momento en que los espermatozoides se liberan de la célula de Sertoli. Esta gota desaparece durante el tránsito epididimario. También son incluidos en esta categoría, cambios de forma y volumen del acrosoma en varias especies (cobayo, conejo, chinchilla y algunos roedores y primates), como así también en la disposición del núcleo y de las membranas de la pieza conectora y en la compactación de cristales mitocondriales (algunos marsupiales) (Bedford, 1979). Entre los cambios submicroscópicos estructurales se encuentra la estabilización de la mayoría de los componentes del espermatozoide a través de la formación de puentes disulfuro en las moléculas que contienen grupos sulfhidrilo (Calvin & Bedford, 1971; Bedford & Calvin, 1974a,b). La formación de estos puentes se da tanto a nivel de las protaminas del núcleo, aumentando la estabilización de la cromatina, como también a nivel de las proteínas estructurales de los distintos componentes de la cola, generando organelas con mayor resistencia a la disrupción mecánica. En conjunto, la estabilización de componentes tanto de la cabeza como de la cola implican que luego de la maduración epididimaria, el espermatozoide maduro se ha convertido en una célula queratinoide muy resistente (Bedford, 1982).

I.3.3 Modificaciones de la membrana plasmática durante la maduración.

Entre los cambios asociados al proceso de maduración, se incluyen las alteraciones que sufre la membrana plasmática del espermatozoide, muchas de las cuales serían necesarias para la ocurrencia de los cambios funcionales mencionados. Si bien las modificaciones que se dan a nivel de la membrana plasmática podrían considerarse incluidas entre los cambios estructurales, debido a su relevancia en relación a este trabajo, son descriptos en una sección independiente.

Teniendo en cuenta, por un lado, que la interacción del espermatozoide con el ovocito ocurre a nivel de su membrana plasmática y, por otro lado, que la maduración epididimaria trae como consecuencia para el espermatozoide la adquisición de capacidad de interacción con el ovocito, resulta comprensible que la membrana plasmática sea, sin lugar a dudas, uno de los principales sitios de cambio durante el tránsito por el epidídimo.

Las primeras evidencias sobre modificaciones a nivel de la superficie del espermatozoide durante la maduración surgieron a partir de estudios que demostraban variaciones en las propiedades reflectoras de la luz en espermatozoides de toro (Lindahl & Kihlstrom, 1952) y a partir de descripciones acerca de diferencias en la afinidad de espermatozoides de conejo y carnero a la eosina durante la maduración (Glover, 1961). Las demostraciones de cambios de adhesividad y densidad de cargas sobre distintas regiones de la superficie de los espermatozoides

durante la maduración proveyeron mayores evidencias a favor de la hipótesis de la existencia de cambios a nivel de la superficie del espermatozoide (Bedford, 1979). Con respecto a la adhesividad, los ejemplos incluían el desarrollo de aglomeraciones de tipo "rouleaux" en el cobayo (Fawcett & Hollemberg, 1963), el apareamiento de espermatozoides de marsupiales provenientes de regiones más distales del epidídimo (Biggers, 1966), o la tendencia de los espermatozoides del cauda, en la mayoría de los mamíferos, a formar aglutinaciones cabeza-cabeza al ser suspendidos en soluciones salinas (Bedford, 1975). Teniendo en cuenta que la adhesividad depende en gran medida de la carga neta de superficie y de la distribución de cargas negativas y positivas, no resultó sorprendente el hecho de que estas diferencias en adhesividad se correspondieran con el comportamiento manifestado por los espermatozoides al ser sometidos a un campo eléctrico (Nevo, 1961; Bedford, 1963). Finalmente, la diferente sensibilidad a los descensos súbitos de temperatura que presentaban los espermatozoides provenientes de las distintas regiones del epidídimo (Scott et al., 1967; Hammerstedt et al., 1979), también resultaba una manifestación de la ocurrencia de alteraciones a nivel de la superficie durante la maduración. Los cambios moleculares y bioquímicos responsables de las alteraciones en las propiedades de la superficie han sido en gran parte caracterizados, e incluyen alteraciones en:

- a) carga de superficie y propiedades de unión de lectinas
- b) distribución de partículas intramembranas.
- c) contenido lipídico
- d) carbohidratos de superficie
- e) composición proteica y glicoproteica

a) *Cambios en la carga de superficie y propiedades de unión de lectinas*

En diversas especies ha sido demostrado que la carga neta negativa de los espermatozoides provenientes del cauda epididimario es mayor que la de los espermatozoides del caput (Bedford, 1963; Moore, 1979). Asimismo, estudios de unión de partículas de hierro coloidal (positivas) a espermatozoides, demostraron que la densidad de las mismas unidas a la cola, y en menor grado las unidas a la cabeza, resultó mayor en espermatozoides maduros que en inmaduros (Yanagimachi et al., 1972). Se cree que, entre otros componentes, la unión de ácido siálico a la superficie de los espermatozoides durante el tránsito por el epidídimo sería en parte responsable del aumento de carga negativa de los mismos (Nicolson et al., 1977; Holt, 1980).

Mediante la utilización de lectinas, ha sido posible estudiar cambios en los sacáridos de superficie durante la maduración epididimaria (Nicolson et al., 1977; Fournier-Delpech et al., 1977; Fournier-Delpech & Courot, 1980). Estos cambios en la capacidad de unión de lectinas que ocurre durante la maduración indican que ciertos residuos sacáridos terminales son alterados (removidos, enmascarados, adicionados) durante este proceso. Estos residuos podrían formar parte de glicolípidos o glicoproteínas y, tal como ha sido demostrado en la rata, (Olson & Danzo, 1981) los cambios en la unión de lectinas podrían deberse, en parte, a modificaciones de estos componentes.

b) *Cambios en la distribución de partículas intramembranas*

Mediante la técnica de ruptura-congelamiento se han descrito también en algunas especies, cambios en la distribución y localización de partículas intramembranas durante el tránsito por el epidídimo. En el jabalí se observó que los espermatozoides de la región distal del caput mostraban una disposición regular y geométrica de partículas intramembranas sobre la región del acrosoma anterior, mientras que en los provenientes del cauda, se observaba una disposición hexagonal de partículas, diferente a la de los espermatozoides más inmaduros (Suzuki, 1981). En los espermatozoides de rata, esta misma autora demostró la aparición de filas paralelas de partículas intramembranas, en la membrana plasmática cubriendo la cabeza de los espermatozoides del caput. Estas filas de partículas desaparecían en la región proximal del cauda (Suzuki & Nagano, 1981).

c) *Cambios en el contenido lipídico*

Los primeros estudios de análisis de cambios en el contenido lipídico de la membrana de los espermatozoides durante la maduración, fueron llevados a cabo utilizando espermatozoides enteros (Grogan et al., 1966; Poulos et al., 1973). Estos estudios, posteriormente confirmados utilizando preparaciones de membranas aisladas (Nikolopoulou et al., 1985), demostraban que, durante el pasaje por el epidídimo, se producía una disminución general en la cantidad de lípidos y específicamente en el contenido de colesterol. Fueron demostradas también variaciones

en las concentraciones de ciertos ácidos grasos, así como también en esteroides como el demosterol o colesterol-sulfato. (Scott et al., 1967; Nikolopoulau et al., 1985). En un modo generalizado, estos cambios podrían interpretarse como una disminución en la estabilidad y un aumento en la "fluidez" de la membrana (Austin, 1985). Evidencias a favor de esta interpretación surgen de estudios en los cuales se utilizó la técnica de recuperación de fluorescencia luego de blanqueo por luz en espermatozoides testiculares y eyaculados de carnero (Wolf & Volgmayr, 1984). En estos estudios se demostró un aumento en la tasa de difusión de un análogo lipídico fluorescente durante la maduración. Estas variaciones de fluidez maduración-dependientes resultaron diferentes entre las distintas regiones de la superficie, corroborando nuevamente la naturaleza heterogénea de la membrana del espermatozoide.

d) Cambios en carbohidratos de superficie

Entre los mecanismos responsables de la alteración de los componentes de superficie durante la maduración, se encuentran los fenómenos de glicosilación. Los homogenatos epididimarios son sumamente ricos en glicosiltransferasas; a su vez, el dolicol, transportador de cadenas laterales de oligosacáridos en el ensamblado de glicoproteínas N-glicosiladas, se encuentra en altas concentraciones en el caput y corpus epididimario de la rata (Wenstrom & Hamilton, 1980). En el epidídimo de rata ha sido descripta la presencia de glucosil y manosiltransferasas andrógeno-dependientes (Iusem et al., 1984), y por otra parte, en el corpus se han encontrado las mayores actividades epididimarias

de β -N-glucosaminidasa, β -N-acetil-galactosaminidasa y β -N-galactosidasa (Chapman & Killian, 1984). Otros estudios han sugerido que los lactosaminglicanos presentes en la superficie de espermatozoides testiculares son fucosilados mediante la acción de una fucosiltransferasa epididimaria (Cossu & Boitani, 1984).

En la rata, se ha detectado actividad de una galactosiltransferasa de UDP-galactosa:N-acetilglucosamina en fluido de rete testis, la cual si bien resultó ser de origen testicular, se concentraba en el caput epididimario (Hamilton, 1980). Los espermatozoides de rata resultaron ser capaces de incorporar galactosa a proteínas de superficie partir de UDP-[14 C]galactosa, produciéndose la mayor incorporación en proteínas de pesos moleculares de 37.000 y 23.000, sugiriendo que existen componentes de superficie que son alterados durante la maduración mediante la galactosilación de residuos de N-acetilglucosamina (Hamilton & Gould, 1982).

Existe también actividad de galactosiltransferasa en la superficie de los espermatozoides (López et al., 1985), diferente de aquella presente en el fluido epididimario (Shur & Hall, 1982a), la cual podría estar también involucrada en las modificaciones madurativas de la superficie. Este tipo de enzimas de superficie estaría regulada por la α -lactalbúmina, la cual sería aparentemente producida por el epidídimo (Quasba et al., 1983). La galactosiltransferasa interactúa con la α -lactalbúmina presente en el fluido epididimario para formar lactosa sintetasa, la cual a su vez, cataliza la transferencia de galactosa desde UDP-galactosa a glucosa determinando la formación de lactosa (Brobek et al., 1967).

e) *Cambios en la composición proteica*

La membrana plasmática sufre también extensas modificaciones en su composición proteica durante el proceso de maduración (Bedford, 1975; Orgebin-Crist et al., 1975; Yanagimachi, 1981a; Austin, 1985). Estos cambios surgen como consecuencia de la adición de nuevos componentes proteicos a la superficie del espermatozoide, o por pérdida, desenmascaramiento o modificación de moléculas preexistentes. Todos estos cambios han sido identificados mediante métodos bioquímicos o mediante la utilización de anticuerpos dirigidos contra componentes de la superficie del espermatozoide o contra componentes del fluido epididimario. Muy probablemente, conjuntamente con posibles variaciones en el contenido glicolipídico, estos cambios en la composición proteica son los responsables de la mayoría de las modificaciones previamente descritas de carga de superficie y unión a lectinas que ocurren durante la maduración epididimaria.

Los cambios que involucran componentes particulares generalmente ocurren dentro de regiones específicas del epidídimo, aumentando las evidencias a favor de una participación activa de este órgano en las modificaciones de la superficie del espermatozoide durante la maduración (Eddy, 1988).

Mediante estudios bioquímicos en los cuales se utilizó la marcación vectorial de espermatozoides provenientes de distintas regiones del epidídimo, se logró detectar la aparición de nuevos componentes de superficie durante el tránsito por el conducto epididimario. Es así que por ejemplo, la técnica de marcación por galactosa-oxidasa-tritio-borhidruro se utilizó para marcar los residuos D-galactosa o N-acetil D-galactosamina accesibles, detectándose de este modo la aparición de una glicoproteína de

37.000 dalton de peso molecular en los espermatozoides provenientes del cauda epididimario de la rata (Olson & Hamilton, 1978). Resultados similares fueron obtenidos al utilizar la iodinación catalizada por lactoperoxidasa para marcar los residuos de tirosina o al emplear Concanavalina A (Con A) conjugada con fluoresceína para identificar bandas pertenecientes a glicoproteínas en geles de poliacrilamida (Olson & Danzo, 1981). Utilizando metodologías similares, ha sido posible determinar que uno de los cambios más importantes de membrana durante la maduración de los espermatozoides de rata es el incremento en la superficie de los mismos de una glicoproteína de un peso molecular oscilante, de acuerdo a los autores, entre los 31.000 y 37.500 dalton (Jones et al., 1981; Toowicharanout & Chulavatnatol, 1983; Brown et al., 1983; Zaheb & Orr, 1984). A su vez, también ha sido posible detectar cambios asociados a la maduración en otras especies como el conejo (Nicolson et al., 1979), toro (Vieurla & Rajaniemi, 1980), carnero (Volgmayr et al., 1983), cerdo (Russel et al., 1984) y chimpancé (Young et al., 1985) mediante la utilización de las técnicas de marcación mencionadas.

La utilización de métodos inmunológicos en combinación con técnicas bioquímicas demostró también ser efectiva en la identificación de diferencias en la composición de superficie que surgen con la maduración de los espermatozoides. En general, los anticuerpos dirigidos contra componentes totales de espermatozoides o fluido epididimario reaccionan indistintamente con ambos antígenos, sugiriendo la existencia de componentes del fluido que se unen a la superficie de los espermatozoides. A estos componentes se los ha denominado "cobertores" del

espermatozoide (Hunter, 1969; Dravland & Joshi, 1981). Si bien es posible que el reconocimiento de componentes del fluido por anticuerpos contra el mismo o contra espermatozoides resultara consecuencia de la liberación de los mismos desde los espermatozoides hacia al fluido epididimario, varios estudios identificaron inequívocamente componentes secretados por el epidídimo que se unen a los espermatozoides. Es así que por ejemplo, un antisuero contra una glicoproteína ácida epididimaria (AEG) de 33.000 daltons purificada a partir del epidídimo de rata, se utilizó en estudios histoquímicos para demostrar que la misma era secretada por las células principales del epidídimo, y se unía a los espermatozoides a medida que abandonaban el segmento inicial del caput (Lea et al., 1978). Asimismo, los estudios realizados por Garberi et al. (1979) utilizando un anticuerpo contra proteínas epididimarias de la rata (Blaquier & Cameo, 1976), demostraron el origen epididimario específico de las mismas. Mediante el uso de geles de poliacrilamida, las proteínas SEP demostraron ser una mezcla compleja que incluía glicoproteínas positivas a la tinción con ácido periódico de Schiff. Más adelante se hará referencia a las mismas en forma más detallada. En otra serie de estudios Brooks y colaboradores aislaron y purificaron cuatro proteínas a partir del caput epididimario de rata (Brooks & Higgins, 1980; Brooks, 1981) determinando, mediante la utilización de antisueros y métodos de marcación de superficie, su unión con distintos grados de afinidad a los espermatozoides epididimarios. Dos de ellas resultaron ser específicamente epididimarias (Brooks, 1983; Brooks & Tiver, 1983). Una sialoproteína denominada "SP" (37500 daltons y pI 4.7) también fue purificada a partir del cauda epididimario de rata, demostrándose mediante técnicas

inmunohistoquímicas su localización en la superficie apical de las células del caput y corpus epididimario, en el citoplasma de ciertas células epiteliales epididimarias y en espermatozoides presentes en el lumen del epidídimo (Faye et al., 1980). En la rata también, mediante la utilización de alta fuerza iónica, fueron extraídas dos glicoproteínas extrínsecas de 50.000 y 100.000 daltons de peso molecular (Rifkin & Olson, 1985) presentes en espermatozoides del cauda. Anticuerpos dirigidos contra las proteínas mencionadas, reconocieron antígenos en el citoplasma de las células principales de la región del cauda proximal del epidídimo.

Es probable que varios de los trabajos en los cuales ha sido identificada una glicoproteína epididimaria de peso molecular entre 24.000 y 37.000 daltons, que se asocia a la superficie de los espermatozoides de rata durante la maduración, estén referidos a la misma proteína (Eddy, 1988).

A pesar de que los productos epididimarios que se asocian a la superficie de los espermatozoides han sido estudiados fundamentalmente en la rata, trabajos realizados en otras especies demuestran que la adquisición de proteínas epididimarias durante la maduración resulta ser un fenómeno generalizado. Tal es el caso del conejo, en el cual las glicoproteínas epididimarias se asocian primero a los espermatozoides del caput distal y corpus proximal del epidídimo (Moore, 1980). En el hamster, en cambio, las mismas comienzan a asociarse en la región del caput proximal (Moore, 1980; González Echeverría et al., 1982). En el humano, un antisuero contra espermatozoides eyaculados reacciona específicamente contra fluido y espermatozoides epididimarios, reconociendo un producto

secretorio epididimario que se une a los mismos (Tezón et al., 1985b).

Estudios realizados en distintas especies en los cuales se utilizaron anticuerpos monoclonales con el fin de examinar la aparición de antígenos en la superficie de los espermatozoides durante la maduración, han permitido "mapear" los cambios de la membrana plasmática de espermatozoides durante la maduración, identificando antígenos restringidos a dominios específicos. Tal es el caso de la rata (Gaunt et al., 1983; Jones et al., 1985), hamster (Moore & Hartmann, 1984) y ratón (Feuchter et al., 1984).

La composición proteica de la membrana plasmática de los espermatozoides se ve alterada también por la pérdida de componentes de superficie que ocurre durante la maduración. Uno de estos componentes es una glicoproteína de 110000 daltons, identificada mediante la técnica ya mencionada de marcación por galactosa-oxidasa-tritio-borhidriro en espermatozoides testiculares de rata, la cual no fue detectada en los espermatozoides del cauda epididimario (Jones et al., 1981; Brown et al., 1983). En otra serie de estudios en la rata, tres componentes de 94.000, 72.000 y 59.000 daltons resultaron iodados por marcación con lactoperoxidasa en espermatozoides provenientes del caput, pero no se detectaron en aquellos provenientes del cauda epididimario (Olson & Orgebin-Crist, 1982). Sin embargo, en los estudios mencionados, no pudo ser determinado si la pérdida de detección de los componentes fue debido a: (a) su liberación de la superficie del espermatozoide; (b) su modificación en el peso molecular a causa de procesos como una proteólisis limitada o adición de nuevas moléculas; (c) su

enmascaramiento por otras moléculas provocando que los mismos, a pesar de estar aún presentes, no resultaran accesibles a la marcación de superficie.

Finalmente, la aparición de nuevos antígenos en la superficie celular durante la maduración podría también deberse a una alteración o desenmascaramiento de proteínas preexistentes. A pesar de que no existen ejemplos certeros de aparición de componentes por estos fenómenos, un posible caso lo constituirían los espermatozoides de ratón. Mediante la utilización de un anticuerpo monoclonal se identificó un antígeno de 31000 daltons presente en la superficie del flagelo de los espermatozoides del cauda (Eddy, 1988). El antígeno aparecía gradualmente a medida que los espermatozoides atravesaban la región media del corpus, en principio como especies de alto peso molecular, para luego irse convirtiendo en la proteína final, de menor tamaño, sugiriendo que la modificación involucraba la proteólisis limitada del mismo. En este sentido, se han identificado proteasas (Jones, 1978; Mann & Lutwak-Mann, 1981) y glicosidasas (Chapman & Killian, 1984) en el epidídimo, entre las cuales la β -galactosidasa y la β -glucuronidasa son secretadas en cantidades importantes por células epiteliales de rata en cultivo (Skudlarek & Orgebin-Crist, 1986). Estas enzimas podrían ser responsables del desenmascaramiento de componentes de maduración de la membrana del espermatozoide a través de la degradación parcial de glicoproteínas de superficie. A su vez, un inhibidor de proteasa de origen epididimario ha sido aislado en el ratón (Poirier & Jackson, 1981). Estos resultados sugerirían que este tipo de moléculas podría estar involucrado en la regulación y limitación de las modificaciones de membrana mediadas por enzimas en el epidídimo.

En general, teniendo en cuenta los cambios mencionados, la maduración de los espermatozoides en el epidídimo podría ser considerada como un proceso en cuatro etapas, no necesariamente consecutivas entre sí, consistiendo las mismas en:

- i. movilización de sistemas metabólicos para la producción de energía y motilidad,
- ii. estabilización de componentes proteicos nucleares y estructurales,
- iii. desestabilización y aumento de fluidez de la membrana plasmática,
- iv. adquisición de una cobertura proteica protectora.

I.4. Eyaculación de los espermatozoides

Los espermatozoides maduros alojados en el epidídimo, suspendidos en secreciones provenientes tanto del mismo órgano como del testículo, son transportados gracias al flujo de secreciones epididimarias hacia el *conducto deferente* y, a partir de allí, durante el proceso de eyaculación, entran y atraviesan la *uretra* para ser finalmente eyaculados. Durante el transporte por la uretra, los espermatozoides se cubren de secreciones provenientes de las glándulas accesorias: las vesículas seminales, próstata, glándulas ampulares, bulbo-uretrales (de Cowper) y uretrales (de Littré). Todas estas secreciones conforman el plasma, o la porción fluida del semen, pero la

contribución relativa de cada glándula es diferente entre sí y también entre las distintas especies.

Durante el proceso de eyaculación, se producen nuevas alteraciones en la composición de superficie, entre las cuales se incluyen cambios en la carga de superficie (Moore & Hibbits, 1975; Moore, 1979) y unión de lectinas (Nicolson & Yanagimachi, 1972; Nicolson et al., 1977), cambios en composición lipídica (Langlais & Roberts, 1985); así como también adsorción de diferentes antígenos. Entre estos últimos se incluyen los antígenos correspondientes a grupos sanguíneos (Edwards et al., 1964; Boettcher, 1968); antígenos de histocompatibilidad (Kerek et al., 1973) y factores inmunosupresores (James & Hargreave, 1984).

Los espermatozoides también resultan cubiertos por proteínas producidas específicamente por las glándulas accesorias y adsorbidas a partir del plasma seminal (Vieurla & Rajaniemi, 1980; Herr & Eddy, 1980; Koehler et al., 1980; Draveland & Joshi, 1981; Abrescia et al., 1985). Varios de los componentes que se asocian a los espermatozoides durante la eyaculación han sido localizados en dominios específicos (Irwin et al., 1983; Isaacs & Coffey, 1984). Por otro lado, algunos componentes del plasma seminal interactuarían entre sí para favorecer su posterior unión a la superficie del espermatozoide (Paonessa et al., 1984).

Las consecuencias más obvias de la inmersión de los espermatozoides en las secreciones seminales, tal como ocurre en el momento de la eyaculación, serían similares a las que ocurren al diluir los espermatozoides en un medio apropiado: manifestación de una motilidad muy activa y aumento de la tasa metabólica. En condiciones naturales, los espermatozoides se encuentran inmersos en el plasma seminal por un período muy corto

(también variable según las especies), luego de lo cual el medio inmediato que los rodea resulta progresivamente dominado por las secreciones del tracto genital femenino. Se podría inferir, por lo tanto, que la acción de los componentes seminales sería la de acondicionar a los espermatozoides para su misión inmediatamente posterior, el tránsito a través del tracto genital femenino. Por otro lado, una vez producida la inseminación, la función principal de la motilidad sería la de mantener a los espermatozoides en suspensión y, de este modo, prevenir que las células resulten atrapadas en los canales y lúmenes de las glándulas presentes en la mucosa del tracto. De hecho, una de las antiguas teorías acerca del papel desempeñado por los espermatozoides en la concepción de un nuevo individuo sostenía que la función de los mismos consistía en mantener al "semen" bien agitado (Austin, 1985). Por otro lado, existen ciertas etapas durante el transporte por el tracto de la hembra, en las cuales la motilidad resulta esencial y altamente ventajosa.

I.5. Capacitación de los espermatozoides

Los espermatozoides maduros liberados del epidídimo e inclusive los eyaculados no son aún capaces de fertilizar a un ovocito. Esto ocurre en todas las especies de mamíferos estudiadas hasta el momento. Hace ya cuarenta años Austin (1951) y Chang (1951) demostraron, en forma simultánea, que los espermatozoides necesitan permanecer durante cierto período en el tracto genital femenino antes de poder expresar la capacidad fertilizante adquirida durante la maduración epididimaria. Al conjunto de cambios fisiológicos sufridos por los espermatozoides durante su

residencia en el tracto femenino, se lo denominó *capacitación* (Austin, 1952). Si bien los autores mencionados demostraron la necesidad del período de residencia en el tracto femenino, dejaron abierta la posibilidad de que sus resultados fueran producto de un artefacto técnico. Para descartar esta posibilidad, pusieron en apareo ratas luego del momento de la ovulación, permitiendo así el encuentro inmediato de los espermatozoides con los ovocitos, sin haber tenido un período de residencia previo en el tracto femenino y, a su vez, evitando manipulaciones experimentales (Austin, 1952; Austin & Braden, 1954). Los resultados demostraron claramente que siempre se producía un retraso de dos horas antes de que los ovocitos fueran penetrados, pero luego la penetración progresaba rápidamente alcanzando los niveles normalmente obtenidos cuando se producían apareos normales. La única interpretación de este retraso era la hipótesis de un proceso de maduración adicional en el tracto de la hembra necesario para la entrada del espermatozoide al ovocito.

Posteriormente, en numerosas ocasiones, esta teoría fue ampliamente corroborada, no sólo para los mamíferos euterianos, sino también para algunos marsupiales (Bedford, 1982). No resulta muy claro el significado biológico de la necesidad de este paso adicional, sobretudo porque no es clara aún la etapa evolutiva en la cual se produce la aparición de la necesidad de un proceso de "capacitación" de los vertebrados. Es probable que la misma se encuentre funcionalmente ligada a la existencia de los eventos correspondientes a la maduración epididimaria en el macho (Bedford, 1982).

Si bien no se conoce con exactitud en qué consiste precisamente la capacitación, han sido estudiados varios de los mecanismos

involucrados en este proceso. Uno de ellos, de fundamental importancia, consiste en la remoción y alteración de sustancias adsorbidas o integradas a la membrana plasmática durante los procesos de maduración y eyaculación. Esta remoción y alteración de la "cobertura protectora" a la cual se ha hecho referencia anteriormente (ver sección I.3.3.), "sensibilizaría" a la membrana a los componentes del medio específico en el cual se produce la fertilización y/o a aquellos del ovocito o sustancias que pudieran emanar de él.

La capacitación tiene lugar en el tracto genital de las hembras en estro. La Fig. I.9 esquematiza la disposición de los órganos reproductivos internos de la hembra (en particular, de un roedor). En el esquema presentado es posible observar dos cuernos uterinos, que se conectan con el oviducto a través de la *unión utero-tubaria*. A continuación del útero, se dispone el *isthmus* del oviducto, el cual se continúa con la *ampulla* del mismo órgano. La región extrema de la ampulla se denomina *infundibulum*, y contiene al *ostium*, siendo éste el sitio por el cual se produce la captura de los ovocitos en el momento de la ovulación. El ostium se encuentra situado por dentro de la *bursa ovárica*, la cual a su vez, contiene al ovario.

El sitio en el cual se produce la capacitación varía de especie en especie. En aquellas especies en las cuales los espermatozoides se depositan en la vagina durante el coito (ej. conejo y humano), es muy probable que este proceso comience durante el pasaje de los mismos a través del mucus cervical. Si bien en el conejo la capacitación puede completarse en el útero (Adams & Chang, 1962; Bedford, 1969, 1983b), esto no implica que ésta sea la situación bajo condiciones naturales. Existen

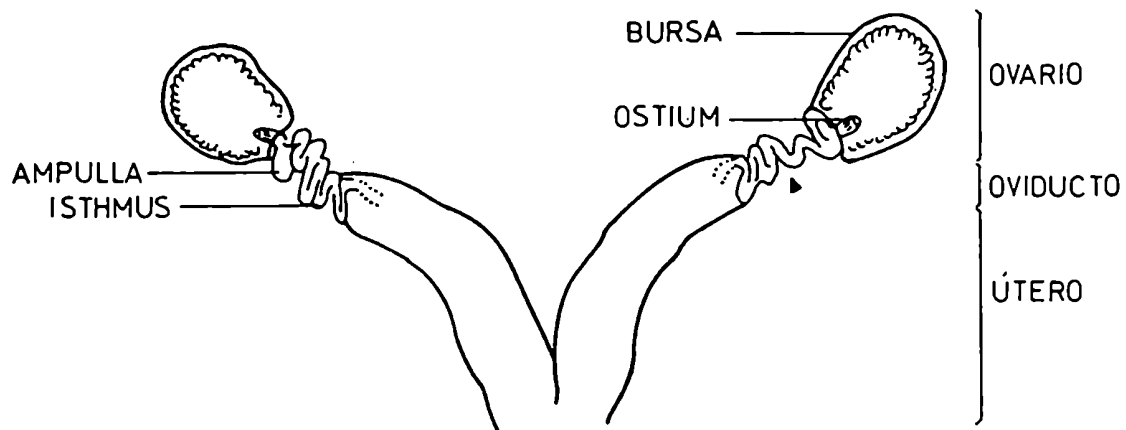


Fig. I.9. Organos reproductivos internos de la hembra.

La punta de flecha señala la región aproximada de unión entre el isthmus y la ampulla del oviducto.

trabajos en los cuales se demuestra que los espermatozoides que participan en la fertilización permanecen en la región del isthmus durante un número de horas previas al comienzo de la ovulación (Overstreet et al., 1978). Resulta probable, por lo tanto, que los espermatozoides se capaciten parcialmente en el útero, y luego completen su capacitación en el oviducto.

En aquellas especies como el conejo, en las cuales la capacitación puede completarse en el útero, los espermatozoides que han pasado por ambos compartimentos se capacitan más eficientemente que los que han permanecido en uno solo de ellos (Bedford, 1983b). En las especies en las cuales el semen se deposita directamente en el útero (ej. roedores y cerdo), el principal sitio de capacitación sería el oviducto. En estas especies también los espermatozoides permanecen en la región del isthmus un cierto tiempo antes de ascender a la ampulla (Hunter, 1984). A su vez, sólo una pequeña fracción de estos espermatozoides son los que finalmente llegan al sitio de fertilización (la ampulla) (Harper, 1988).

Los espermatozoides incubados en localizaciones ectópicas como el cólon, vejiga, vesícula seminal, o cámara anterior del ojo pueden comenzar la capacitación, pero no completarla (Noyes et al., 1958; Hamner & Sojka, 1967), lo cual sugirió en un principio que el tracto genital de la hembra poseía factores específicos que facilitan la capacitación. Sin embargo, como se verá mas adelante, diversos sistemas *in vitro* resultan aptos para la ocurrencia de este proceso, lo cual estaría indicando la ausencia de factores de esta naturaleza. A pesar de que la capacitación puede ocurrir bajo condiciones totalmente *in vitro*, la capacitación *in vivo* probablemente dependa de más factores que la

temperatura, el pH y la osmolalidad de un medio balanceado. En particular, el potencial capacitante del tracto femenino depende en gran medida de la situación endócrina de la hembra. Es así que ha sido demostrada una inhibición del potencial capacitante del útero en el conejo (Chang, 1958; Bedford, 1970) y del oviducto en el hamster (Viriyapanich & Bedford, 1981) en momentos del ciclo dominados por progesterona. Es probable que la falta de capacitación provocada por la alta concentración de progesterona, refleje la ausencia de factores activos, y no la presencia de factores inhibitorios. Una segunda evidencia a favor de la influencia de factores específicos presentes en el tracto de la hembra sobre el proceso de capacitación, lo constituye el hecho ya mencionado de que el "potencial capacitante" sea diferente para cada región del tracto femenino, pudiendo ser encontrado un sinergismo entre el medio del útero y el del oviducto (Adams & Chang, 1962).

Resulta interesante mencionar que la capacitación no es un fenómeno especie-específico ya que los espermatozoides y ovocitos de una especie pueden completar la fertilización en el tracto genital de una hembra de otra especie (Saling & Bedford, 1981). Por otro lado, estas mismas manipulaciones experimentales permitieron determinar que el tiempo de capacitación sería de naturaleza especie-específica (Saling & Bedford, 1981).

Al considerar el tiempo en el cual se produce la capacitación, es importante destacar que aún bajo idénticas condiciones *in vitro*, todos los espermatozoides de una misma población no se capacitarían al mismo tiempo (Bedford, 1983b). El "tiempo de capacitación", medido en base a la fertilización, es solamente una medida del momento en el cual algunos espermatozoides de una

muestra adquieren capacidad de fertilizar un ovocito. Sin embargo, en el mismo momento, la gran mayoría de los espermatozoides puede no haber alcanzado el mismo estado fisiológico de capacitación. Si bien bajo condiciones *in vivo*, esta variación entre espermatozoides podría estar parcialmente determinada por diferencias en la velocidad de transporte de los mismos desde el compartimento uterino al del oviducto, bajo condiciones *in vitro*, la asincronía en la capacitación estaría indicando la existencia de variaciones individuales de los espermatozoides entre sí.

Como ha sido mencionado, los procesos de capacitación y fertilización pueden producirse completamente *in vitro*, sin contribuciones del tracto femenino. Tal como se describió al inicio de este trabajo, el primer estudio en el cual se demostró la ocurrencia de la capacitación *in vitro* fue realizado en el año 1963 por Yanagimachi y Chang. Los sistemas utilizados en estos primeros y pioneros trabajos resultaban en cierto modo un poco crudos ya que se utilizaban fluidos biológicos y, por lo tanto, no podían ser analizados los elementos causantes de la capacitación. Fue Toyoda con sus colaboradores (1971) quien por primera vez demostró la ocurrencia de una fertilización (y capacitación) *in vitro* en un medio químicamente definido. Desde entonces, más allá de los requerimientos propios de los espermatozoides de cada especie, el análisis de los mecanismos responsables de la capacitación ha sido enormemente simplificado.

Sin embargo, cabe mencionar que las condiciones bajo las cuales se produce la capacitación *in vitro* no son necesariamente las mismas bajo las cuales se produciría este fenómeno *in vivo*, ya que los eventos que ocurren bajo condiciones naturales podrían resultar diferentes de lo que ocurre en un medio artificial.

I.5.1. Eventos que ocurren durante la capacitación

a) Cambios en el sistema adenilato ciclasa/proteína kinasa

Así como no existen dudas acerca de la participación de las enzimas adenilato ciclasa y proteína kinasa dependiente de AMPc en la iniciación y mantenimiento de la motilidad de los espermatozoides durante la capacitación (Tash & Means, 1983), también resulta altamente probable que estos sistemas se encuentren involucrados en la capacitación per se. Existen evidencias acerca del incremento en la actividad de la adenilato ciclasa durante la capacitación (Berger & Clegg, 1983; Stein & Fraser, 1984). Este incremento en la actividad de esta enzima traería como consecuencia un aumento de la cantidad disponible de AMPc (Stein & Fraser, 1984), el cual a su vez, estimularía a la proteína kinasa dependiente de AMPc. Esta enzima podría alterar, a través de la fosforilación, la estructura terciaria y cuaternaria de proteínas de membrana (Hyne & Edwards, 1985) resultando en cambios en las propiedades de la misma (por ej. en la permeabilidad a los iones).

b) Cambios en iones intracelulares

Los espermatozoides, así como el resto de las células vivas, mantienen eficientemente gradientes iónicos a través de la

membrana plasmática. En el caso del Na^+ y el K^+ , existiría una activa bomba de intercambio Na^+/K^+ ATPasa que mantiene una mayor concentración de K^+ en el interior celular, mientras que lo contrario ocurre con el Na^+ (Yanagimachi, 1988a). Existen trabajos que demuestran que durante la capacitación se producen cambios en las concentraciones intracelulares de estos iones (Hyne et al., 1985), e incrementos en la actividad de la enzima Na^+/K^+ ATPasa (Mrnsy et al., 1984).

En cuanto al ión calcio, existen controversias acerca de su cinética durante este proceso. Es un hecho generalmente aceptado que las concentraciones de calcio intracelular resultan bajas a causa de la presencia de una bomba ATPasa y de un mecanismo antiporter $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en la membrana plasmática (Breitbart et al., 1985). Así como en el cobayo se ha reportado la captación de Ca^{2+} radioactivo durante la capacitación (Singh et al., 1978), en el conejo, Mahanes y colaboradores (1986) no encontraron variaciones de calcio intracelular.

c) Cambios en la membrana plasmática

Como ha sido mencionado anteriormente, entre los cambios más importantes que sufren los espermatozoides durante la capacitación se encuentran aquellos que ocurren a nivel de la membrana plasmática, lo cual fue primeramente postulado por Weinman y Williams (1964) y Piko (1967), acumulándose desde entonces, una enorme cantidad de evidencias a favor de este postulado. Entre los cambios descritos que ocurren durante la capacitación a nivel de membrana, en diversas especies, es posible enumerar los siguientes:

- disminución de la carga negativa de superficie (Vaidya et al., 1971; Courtens & Fournier-Delpech, 1979)
- cambios en la capacidad de unión de lectinas (Talbot & Franklin, 1978; Koehler, 1981)
- cambios en la distribución de partículas intramembranas (Tesarik, 1984; Suzuki & Yanagimachi, 1989)
- cambios en la fluidez de membrana (Wolf et al., 1986 ; Soucek et al., 1985)
- cambios en la composición lipídica (Davis et al., 1979)
- cambios en la composición proteica (Johnson, 1975; Oliphant & Singhas, 1979; Koehler et al., 1980; Vernon et al., 1985)
- cambios en la unión de anticuerpos (Oliphant & Brackett, 1973b; Koehler, 1976; Vernon et al., 1985; Villarroya & Scholler, 1987)

Cabe destacar que los cambios enumerados podrían en algunos casos representar diversas manifestaciones de un mismo mecanismo (ej. la remoción de proteínas se puede manifestar tanto como una disminución de carga negativa, como un cambio en la unión de los anticuerpos que las reconocen, o en caso de tratarse de glicoproteínas, como un cambio de afinidad por ciertas lectinas). En forma general, los cambios evidenciados, tienden a aumentar la fluidez y desestabilización de la membrana.

En particular, ha sido prestada mucha atención hacia dos mecanismos involucrados en las variaciones manifestadas por la membrana plasmática durante la capacitación, siendo éstos, la pérdida de proteínas y la remoción de lípidos de la superficie celular.

Entre los casos descritos de remoción de proteínas se encuentra un antígeno de ratón de origen epididimario, SMA 4, el cual se localiza en la cola de los espermatozoides maduros, pero desaparece durante la capacitación tanto *in vivo* como *in vitro* (Vernon et al., 1982; 1985). En el carnero, se han descrito una serie de glicoproteínas localizadas en la superficie de espermatozoides eyaculados, las cuales son liberadas durante la incubación de los espermatozoides en fluido uterino y en fluido del oviducto al mismo tiempo que se produce la adsorción de una proteína a partir del fluido uterino (Volgmayr & Sawyer, 1986). A pesar de que en estos estudios no se evaluó si los fluidos utilizados provocaban la capacitación *in vitro* de los espermatozoides, los mismos resultan una importante evidencia a favor de la ocurrencia de la remoción de componentes de superficie durante la capacitación *in vivo*.

Actualmente es poco lo que se conoce acerca de la naturaleza de las proteínas removidas o eluidas durante la capacitación. Una de ellas podría ser la fibronectina o proteínas similares (Koehler et al., 1980), las cuales podrían entrecruzar a las proteínas intrínsecas de la membrana plasmática, y "congelar" su movimiento lateral dentro de la bicapa lipídica. Por lo tanto, su elución de la membrana, liberaría a las proteínas intrínsecas, permitiéndoles movimiento mas allá del dominio en el cual se encontraban originalmente localizadas. De este modo podrían explicarse, en parte, los fenómenos de redistribución de componentes de membrana que se han asociado con la capacitación (Villarroya & Scholler, 1987; Suzuki & Yanagimachi, 1989; Jones et al., 1990). Otro grupo de componentes liberados durante la capacitación, serían ciertas proteínas adsorbidas a partir del plasma seminal, las cuales se postulan como poseedoras de un

papel estabilizador de la membrana. Una de las proteínas mencionadas, sería el denominado "factor estabilizante del acrosoma" (ASF, Oliphant et al., 1985) y la ya mencionada α -lactalbúmina (Shur & Hall, 1982b).

En cuanto a los lípidos removidos durante la capacitación, se ha prestado interés a la remoción de colesterol como uno de los mecanismos responsables del aumento de fluidez de membrana (Go & Wolf, 1983). Por un lado, en la rata, Davis (1981) postuló que la remoción gradual de colesterol de la membrana plasmática ya sea por albúmina o algún componente del tracto genital de la hembra, sería una parte esencial de la capacitación. Por otro lado, en el conejo, los espermatozoides capacitados *in vivo* pierden capacidad fertilizante al ser transferidos a un medio rico en colesterol (Davis, 1976). Si bien la importancia de este mecanismo ha sido remarcada por varios autores (Go & Wolf, 1983; Langlais & Roberts, 1985), la depleción de colesterol de las membranas durante la capacitación no sería un evento tan importante y serían sólo áreas muy limitadas las que aparecerían libres de colesterol (Yanagimachi, 1988a). Resultaría más probable que fuera la ocurrencia de una separación de fase entre los lípidos y el colesterol de membrana (debido a una migración lateral de estas moléculas para la formación de dominios), un mecanismo importante para la capacitación (Yanagimachi, 1988).

I.5.2. Decapitación y factores decapitantes

En 1957, Chang demostró que al incubar espermatozoides capacitados por un corto tiempo en plasma seminal, lograba la

reversión de los mismos a un estado de "decapitación". Para determinar el estado de capacitación de los espermatozoides se recurrió al siguiente esquema experimental: los espermatozoides se depositaron en el oviducto de hembras recientemente ovuladas, y se determinó el tiempo en el que ocurría la fertilización. En el conejo, los ovocitos tienen una vida media muy corta (5 hs, Dukelow et al., 1969). Por lo tanto, si los espermatozoides estaban completamente capacitados, se producía la fertilización en forma inmediata. Si, en cambio, no lo estaban, los ovocitos degeneraban antes de que los espermatozoides pudieran completar su capacitación. Es así que los estudios de Chang (1957) demostraron que la incubación de los espermatozoides con plasma seminal, inhibía la capacidad fertilizante de los mismos, la cual era posteriormente recuperada luego de seis horas de permanencia en el tracto femenino. Por lo tanto, estos estudios también permitieron demostrar que el fenómeno de decapitación resultaba ser reversible. Este trabajo permitió, por un lado, establecer la existencia de factores decapitantes en el plasma seminal, removibles durante la capacitación y, por otro, sentó las bases del bioensayo para la decapitación reversible. Mediante la utilización de este bioensayo se identificaron factores decapitantes en diversas especies. Es así que los estudios realizados por Weinman y Williams en 1964, demostraron que la actividad decapitante se encontraba presente en el fluido epididimario. Estos resultados resultaban compatibles con las observaciones de Chang (1957), las cuales indicaban que así como los espermatozoides eyaculados, los espermatozoides epididimarios también requerían la capacitación para fertilizar al ovocito.

El modelo de mosaico fluido de la membrana plasmática establecido por Singer y Nicholson (1972) establece la existencia

de proteínas inmersas en la bicapa lipídica, las cuales sólo pueden ser extraídas por detergentes (componentes integrales), y proteínas periféricas asociadas a la membrana a través de uniones iónicas, extraíbles elevando la fuerza iónica del medio. En base a este modelo, la actividad decapacitante del plasma seminal debería estar asociada a la membrana plasmática como uno o más componentes periféricos. Esta hipótesis se ve reforzada por experimentos que demuestran que la fertilización de ovocitos de ratón *in vitro* puede ser acelerada mediante la incubación de espermatozoides en un medio con alta fuerza iónica (Fraser, 1983a). A su vez, los componentes disociados del espermatozoide por extensivo lavado o alta fuerza iónica, demostraron tener actividad decapacitante (Fraser, 1984).

Según Oliphant et al. (1985), en base a las observaciones mencionadas, se podría postular que el proceso de capacitación podría ocurrir como un desplazamiento de un equilibrio. Cuando los espermatozoides se encuentran en un medio que favorece la disociación en masa, la capacitación ocurre. *In vivo*, esto ocurriría cuando los espermatozoides pasan de un medio muy rico en factores decapacitantes como el tracto masculino, a un medio desprovisto de los mismos, como el tracto femenino. *In vitro*, esto se mimetizaría por la alta dilución de los espermatozoides en el medio de incubación. Los distintos tiempos de capacitación para las distintas especies podrían explicarse, según estos mismos autores, en base a las diferentes afinidades de los factores mencionados a la membrana de los espermatozoides.

I.6. Consecuencias de la capacitación:

I.6.1. Hiperactivación de los espermatozoides

El resultado último de la larga serie de cambios que ocurren tanto durante la maduración de los espermatozoides en el epidídimo, como durante la capacitación en el tracto genital femenino, es la adquisición definitiva por parte del espermatozoide de capacidad para fertilizar al ovocito. Específicamente, esto implica que el espermatozoide debe desarrollar la capacidad de llegar al ovocito, penetrar las envolturas que lo rodean, y finalmente, fusionarse con el oolema para incorporarse al ooplasma. Algunos autores (Austin, 1985) denominan proceso de "maduración" a toda la serie de cambios sufridos por el espermatozoide desde que es liberado de la célula de Sertoli hasta que es capaz de fertilizar al ovocito. Esto se basa en que los mismos consideran a la maduración epididimaria y la capacitación como una serie de cambios continuos, sufridos por una misma célula, el espermatozoide, los cuales contribuyen a determinar la funcionalidad completa del espermatozoide. Como ha sido mencionado anteriormente, si bien durante el ascenso de los espermatozoides dentro de la hembra juegan un papel importante las actividades secretorias y musculares del tracto femenino, la motilidad propia del espermatozoide resulta trascendental en ciertas fases del transporte tales como el ascenso a través del cervix uterino (ej. vaca y humano); el paso a través de la unión utero-tubaria (ej. roedores) y finalmente la penetración a través de las envolturas que rodean al ovocito. Teniendo en cuenta que la maduración otorga al espermatozoide la adquisición de motilidad progresiva, los cambios madurativos serían necesarios, en parte, para estas fases del transporte hacia el ovocito. Sin embargo, este tipo de motilidad no sería suficiente para

atravesar exitosamente todas las barreras mencionadas, sino que como consecuencia de la capacitación, los espermatozoides desarrollan una forma vigorosa y específica de motilidad descrita por primera vez en el hamster por Yanagimachi (1969) quien posteriormente denominó a este tipo de motilidad, *hiperactivación* (Yanagimachi, 1981). En esta especie, la motilidad hiperactivada se caracteriza por movimientos de la cola en forma de latigazos y de la cabeza trazando la figura errática de un ocho. Actualmente no se conoce si la existencia de un tipo de motilidad hiperactivada es un fenómeno generalizado a todos los mamíferos, o si sólo está limitado a un cierto número de especies. Lo cierto es que, si bien el tipo de movimientos involucrados no son necesariamente los mismos, el número de especies en las cuales han sido descritos patrones de motilidad similares a la hiperactivación, ha incrementado considerablemente. Entre éstas se incluye al ratón, murciélago, conejo, delfín, perro, carnero, toro, cerdo, mono rhesus y humano, (Yanagimachi, 1988a y referencias allí citadas). La motilidad hiperactivada, si bien fue descrita originalmente *in vitro*, sería de naturaleza fisiológica ya que pudo ser evidenciada la presencia de espermatozoides en la ampulla del oviducto, previo a la fertilización, mostrando hiperactivación (Yanagimachi, 1970; Katz & Yanagimachi, 1980; Shalgi y Phillips, 1988). Este tipo de motilidad dota al espermatozoide de una fuerza impulsora muy potente, la cual sería necesaria no solamente para ascender del isthmus a la ampulla sino, fundamentalmente para atravesar las envolturas que rodean al ovocito, particularmente la zona pellucida (Katz & Yanagimachi, 1981; Yanagimachi, 1981).

Actualmente son sumamente limitados los conocimientos

existentes acerca de los mecanismos moleculares involucrados en la ocurrencia de motilidad hiperactivada. Como ha sido mencionado, durante la capacitación se producen cambios en las características químicas y físicas de toda la membrana plasmática del espermatozoide, incluyendo la región de la cola. Por lo tanto, resulta probable que varios de estos cambios (remoción de macromoléculas, reordenamiento de partículas intramembranas, cambios de fluidez, etc.) se encuentren directamente vinculados con la adquisición de este tipo de motilidad.

I.6.2. Reacción acrosomal

Tal como ha sido descrito en la sección I.2.2., en la región anterior de la cabeza del espermatozoide, se encuentra el acrosoma, el cual se moldea sobre el núcleo y se encuentra cubierto externamente por la membrana plasmática. Para que el espermatozoide pueda penetrar al ovocito, es necesaria la ocurrencia de la disrupción del acrosoma y de la posterior liberación del contenido acrosomal. A este fenómeno, de naturaleza exocitótica, se lo denomina *reacción acrosomal*. En la Fig. I.10 se esquematiza la secuencia de eventos involucrados en este proceso. En primer lugar, en la región anterior de la cabeza del espermatozoide, se establecen una serie de puntos de contacto entre la membrana plasmática y acrosomal externa, a través de los cuales posteriormente se fusionan ambas membranas. Como consecuencia de la aparición de los puntos de fusión, se produce la formación de vesículas con un origen mixto de membranas (acrosomal externa y plasmática). A través de los espacios que se forman como cosecuencia de esta fusión parcial,

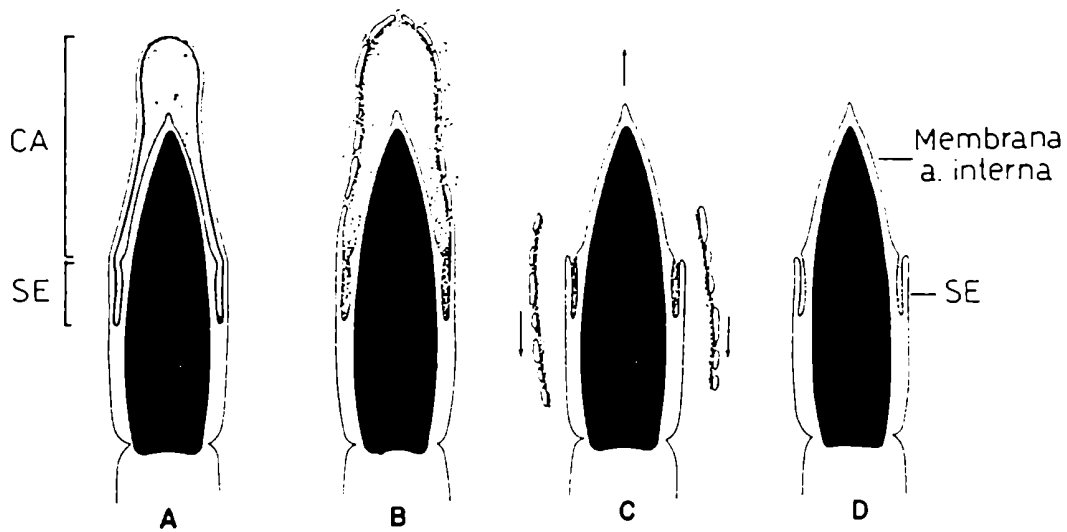


Fig. I.10. Diagramas mostrando la progresión de la reacción acrosomal. (A) Espermatozoide con el acrosoma intacto. (B) Aparición de múltiples puntos de fusión entre la membrana plasmática y membrana acrosomal externa, y posterior vesiculización, permitiendo la liberación del contenido acrosomal. (C,D) La reacción se ha completado. Las vesículas acrosomales se desprenden como consecuencia del avance del espermatozoide.

CA: capuchón acrosomal
 SE: segmento ecuatorial

se libera el contenido acrosomal. Posteriormente, la nube de vesículas originadas a partir de las membranas fusionadas se desprende, y a este fenómeno se lo conoce con el término de "pérdida del acrosoma" o de "pérdida del capuchón acrosomal". Se denomina *intacto* al acrosoma que no presenta modificaciones (Fig. I.10a), *modificado* al acrosoma que presenta alteraciones morfológicas (hinchamiento, rugosidades) sin que haya comenzado la vesiculización, y *reaccionado* al acrosoma que presenta vesiculización de las membranas o que ha sufrido la pérdida del capuchón (Fig. I.10 b-d).

Si bien la existencia de múltiples puntos de fusión entre la membrana acrosomal externa y plasmática durante la reacción acrosomal fue demostrada claramente por primera vez en el conejo y en el hamster (Barros et al., 1967), estas observaciones fueron confirmadas en todas las especies de mamíferos estudiadas hasta el momento. Bajo condiciones normales la región del capuchón acrosomal es la involucrada en la fusión y posterior formación de vesículas (Barros et al., 1967; Bedford & Cooper, 1978), aunque se ha descrito en algunos casos la extensión de la vesiculización hasta la región del segmento ecuatorial (Yanagimachi & Noda, 1970a; Vigil, 1989).

a) *Significado biológico de la reacción acrosomal.*

La ocurrencia de la reacción acrosomal resulta imprescindible para que el espermatozoide pueda fertilizar al ovocito. Esto es debido a dos funciones de la reacción acrosomal, las cuales son:

1. permitir a los espermatozoides la penetración de la zona

pellucida (Austin & Bishop, 1958; Bedford, 1970; Yanagimachi, 1981; Moore & Bedford, 1983)

2. permitir, mediante un mecanismo aún desconocido, un cambio fisiológico a nivel del segmento ecuatorial que otorga a la membrana plasmática del espermatozoide la capacidad de fusión con el oolema (Yanagimachi & Noda, 1970b).

Como se ha visto en la sección I.2.1., todos los ovocitos de mamíferos se encuentran rodeados por la zona pellucida, la cual a su vez, se encuentra inmersa en el cumulus oophorus formado por las células del cumulus y su matriz. Dado que el componente fundamental de la matriz del cumulus es el ácido hialurónico, se postuló que la hialuronidasa liberada del acrosoma reaccionado tendría como función la digestión de la matriz para facilitar el pasaje del espermatozoide a través de la misma (discutido en Talbot, 1985 y Moore & Bedford, 1983). A su vez, teniendo en cuenta que la acrosina es una proteasa, su presencia en la superficie de los espermatozoides reaccionados se postuló como necesaria para el pasaje a través de la zona pellucida (discutido en Moore & Bedford, 1983). Sin embargo, hasta el momento no existen evidencias que demuestren inequívocamente la función de estas enzimas, así como la de otros componentes del contenido acrosomal en el proceso de fertilización. Este punto se discutirá en detalle en la sección I.7.4.

b) *Detección de la reacción acrosomal*

La reacción acrosomal puede visualizarse simplemente por

microscopía óptica en especies cuyos espermatozoides poseen el capuchón acrosomal de un tamaño considerable. Tal es el caso del cobayo, especie en la cual la reacción acrosomal puede visualizarse inclusive con un bajo aumento (Yanagimachi, 1972). En el caso del hamster, si bien el acrosoma es relativamente más pequeño que en los espermatozoides de cobayo (Yanagimachi & Noda, 1970c), también es posible visualizar la ocurrencia de la reacción acrosomal bajo el microscopio óptico. En este caso, se recurre a la microscopía de contraste de fase, para facilitar la visualización de este fenómeno. Finalmente, existen especies en las cuales el acrosoma es, o pequeño, o muy delgado y, por lo tanto, la reacción acrosomal no es visualizable por microscopía óptica (ej. ratón, toro, humano, rata). En los casos de los espermatozoides de humano, ratón y toro, si bien el tamaño del capuchón acrosomal es sumamente pequeño como para poder visualizar su desprendimiento en microscopía óptica, se han desarrollado técnicas que permiten evaluar la ocurrencia de la reacción acrosomal mediante la utilización de anticuerpos dirigidos contra componentes de la membrana acrosomal (Töpfer-Petersen et al., 1985), o contenido acrosomal (Wolf et al., 1985), así como también mediante la utilización de lectinas (Cross et al., 1986), antibióticos fluorescentes (Saling & Storey, 1979) o colorantes específicos (Talbot & Chacon, 1980). Cabe destacar que, hasta el momento, no se ha desarrollado ningún sistema que permita evidenciar la ocurrencia de la reacción acrosomal en los espermatozoides de rata mediante microscopía óptica .

c) Inductores naturales (fisiológicos) de la reacción acrosomal

Bajo condiciones *in vivo*, los espermatozoides capacitados recuperados de la ampulla de hembras apareadas o inseminadas artificialmente, presentan en su gran mayoría o en su totalidad, acrosomas intactos (Bryan, 1974; Overstreet & Cooper, 1979; Cummins & Yanagimachi, 1982; Suarez et al., 1983; Yanagimachi & Phillips, 1984). En cambio, entre los espermatozoides recuperados entre las células del cumulus, se detectan tanto espermatozoides con acrosomas intactos, como modificados o que han perdido el capuchón acrosomal (Yanagimachi & Noda, 1970a; Cummins & Yanagimachi, 1982; Suarez et al., 1983; Yanagimachi & Phillips, 1984). Finalmente, los espermatozoides sobre la zona pellucida de ovocitos contenidos en el cumulus poseen acrosomas modificados o ya reaccionados. En conjunto, estos resultados estarían indicando la naturaleza inductora tanto del cumulus oophorus como de la zona pellucida. No existen dudas acerca de la capacidad de inducción de la reacción acrosomal por parte de la zona pellucida *in vitro* (Florman & First, 1988; Uto et al., 1988). Aún los componentes provenientes de la zona solubilizada poseen capacidad inductora de la reacción acrosomal (Florman & Storey, 1982; Bleil & Wassarman, 1983; Cherr et al., 1986). En el ratón, una de las tres glicoproteínas constituyentes de la zona pellucida, la ZP3, ha sido identificada por un lado, como receptor del espermatozoide a través de su residuo hidrocarbonado, y por otro, como responsable de la inducción de la reacción acrosomal a través de su cadena polipeptídica (Wassarman et al., 1985; Bleil & Wassarman, 1986).

En cuanto a la naturaleza inductora del cumulus oophorus, existen evidencias contradictorias. Si bien varios trabajos indican que la presencia de cumulus enteros, componentes del

cumulus (Tesarik, 1985; Westrick et al., 1985) o componentes de la matriz como glicosaminoglicanos (Lenz et al., 1983; Meizel & Turner, 1986) favorecen o permiten la ocurrencia de la reacción acrosomal, no existe aún evidencia inequívoca de que alguno o varios de estos componentes sea capaz de inducir este fenómeno. Se ha postulado un efecto sinérgico entre elementos presentes en el cumulus y la zona pellucida sobre el espermatozoide para completar la reacción (Cherr et al., 1986). Por lo tanto, en base a los estudios descriptos, resulta probable que tanto la matriz del cumulus oophorus, como el material de la zona pellucida, así como también condiciones físicas o sustancias presentes en el oviducto, tengan cierta capacidad de inducir o facilitar la reacción acrosomal. Por lo tanto, no existiría en el medio de fertilización un único componente crucial para el desencadenamiento de la reacción acrosomal. Parecería más probable que el espermatozoide capacitado se encontrara listo para sufrir la reacción acrosomal, y que su inducción se produjera a medida que avanzara a través de concentraciones crecientes de factores estimulantes, durante el acercamiento al ovocito (Yanagimachi, 1988a).

Más allá de la posibilidad de que entre los componentes mencionados se encuentren los verdaderos inductores fisiológicos, la presencia de los mismos, al menos bajo condiciones *in vitro*, no sería imprescindible para la ocurrencia de la reacción acrosomal. Es un hecho conocido que los espermatozoides son capaces de sufrir este proceso *in vitro* en ausencia de ovocitos o material asociado a los mismos (Bedford, 1983b; Cuasnicú & Bedford, 1988; Bavister, 1989). Resulta probable, entonces, que cualquier condición o agente capaz de modificar de alguna manera

la permeabilidad de la membrana correspondiente a la región del capuchón acrosomal de espermatozoides capacitados a iones involucrados en todo proceso excitotico (ej. Ca^{2+} y Na^{+}), sea capaz de disparar la reacción acrosomal.

d) *Mecanismo molecular de la reacción acrosomal*

Un paso esencial dentro de los mecanismos involucrados en la ocurrencia de la reacción acrosomal, es la entrada de calcio a partir del medio extracelular. Las primeras evidencias a favor de este hecho fueron aportadas por Yanagimachi y Usui (1974) quienes demostraron en el cobayo que, a medida que se agregaba calcio a espermatozoides capacitados en un medio libre de este ión, se producía una inmediata ocurrencia de la reacción acrosomal, la cual no se manifestaba en ausencia del mismo. Posteriormente, Green (1978) demostró que, así como ocurría en los procesos excitoticos de otros tipos celulares (los cuales están modulados por la entrada de calcio), el ionóforo A23187 (el cual provoca un aumento en la entrada del ión mencionado), inducía en espermatozoides de cobayo, una reacción acrosomal de características ultraestructurales normales. Recientemente, ha sido demostrado que el ión HCO_3^- también sería indispensable para la ocurrencia de la reacción acrosomal en algunas especies (Lee & Storey, 1986; Yoshimatsu & Yanagimachi, 1988).

Sin embargo, la entrada de calcio por sí sola no es suficiente para desencadenar todo el proceso. Es muy probable que la gran mayoría de los componentes de la membrana plasmática y acrosomal externa, así como los elementos presentes dentro y fuera de las mismas, se encuentren directa o indirectamente involucrados en

esta reacción. Un modelo recientemente propuesto por Yanagimachi (1988a) describe los eventos moleculares probables que se sucederían durante la reacción acrosomal, con la siguiente secuencia:

1. Dado que la ocurrencia de la reacción acrosomal en la vecindad del ovocito resultaría biológicamente ventajosa, sería necesaria una larga vida útil del espermatozoide para permanecer íntegro durante el transporte en el tracto femenino. El mantenimiento de altas concentraciones intracelulares de K^+ y bajas de Ca^{2+} y Na^+ , no sólo resultaría importante para la sobrevivencia del espermatozoide, sino que también evitaría la ocurrencia de reacciones acrosomales prematuras. A su vez, los gradientes iónicos mencionados se mantendrían gracias a la existencia de una bomba Na^+/K^+ ATPasa y de una Ca^{2+} ATPasa en la membrana.

2. Durante la capacitación, como se ha mencionado, se produce la remoción y alteración de componentes macromoleculares adsorbidos a la superficie celular, de modo que ciertas proteínas integrales de membrana (incluyendo posibles receptores a las envolturas del ovocito) resultarían expuestas. A su vez, la remoción o alteración de esta "cobertura" macromolecular permitiría a las proteínas integrales una mayor libertad de movimiento dentro del plano de la membrana. Esta movilidad de las proteínas en la membrana se vería favorecida por cambios en la organización molecular de la bicapa lipídica en sí misma durante la capacitación, ya sea por la acción de factores endógenos, o exógenos. La albúmina sería uno de los factores exógenos involucrados en la reorganización de la bicapa lipídica.

3. Al entrar los espermatozoides capacitados en contacto con el cumulus o la zona pellucida, los componentes del cumulus o las glicoproteínas de la zona se unirían a los receptores putativos, los cuales a su vez podrían funcionar como transportadores de calcio.

4. Estos receptores, una vez activados, facilitarían la difusión de calcio al interior celular, el cual a su vez inactivaría la bomba Na^+/K^+ ATPasa, resultando en un incremento de Na^+ intracelular y provocando la salida de iones H^+ (a través de un antiporter Na^+/H^+), lo cual finalmente desencadenaría un aumento del pH intracelular.

5. Una vez ingresado el calcio a la célula, a través de su unión a fosfolípidos aniónicos tanto de la membrana plasmática (desde su cara interna) como de la acrosomal externa (desde su cara externa), induciría la separación de fase de los fosfolípidos de membrana facilitando la fusión entre ambas membranas. Por otro lado, este mismo ión activaría fosfolipasas de membrana, las cuales clivarían fosfolípidos cercanos, generando productos fusogénicos (ej. ácido araquidónico y lisofosfolípidos).

6. Una vez que las membranas están próximas a fusionarse o se han fusionado, el calcio ingresaría a la matriz acrosomal, convirtiendo a la proacrosina en acrosina enzimáticamente activa, la cual dispersaría la matriz del acrosoma.

Es importante destacar nuevamente que la reacción acrosomal

puede ocurrir sin contribución alguna del ovocito o componentes asociados a él. Es así que los espermatozoides pueden iniciar y completar la reacción acrosomal en forma espontánea en un medio capacitante *in vitro*. En base al modelo presentado esto podría deberse a (i) activación espontánea de los receptores putativos a los componentes del cumulus y/o zona, o (ii) inactivación de los mecanismos que bombean calcio al exterior celular.

I.7. Penetración del espermatozoide a través de las envolturas del ovocito.

I.7.1. Penetración a través del cumulus oophorus

Originalmente, se creía que para que un espermatozoide pudiera penetrar el cumulus era necesario que varios de ellos nadaran previamente alrededor del mismo de modo de dispersar su matriz. A pesar de que ésto podría suceder al inseminar ovocitos *in vitro*, probablemente no sea ésta la manera en que suceda normalmente *in vivo*, dado que bajo condiciones normales son muy pocos los espermatozoides que se encuentran en las cercanías del ovocito durante la fertilización (Cummins & Yanagimachi, 1982).

Aún es desconocido el mecanismo que permite a los espermatozoides atravesar el cumulus oophorus. Los espermatozoides no capacitados del conejo, rata y ratón pueden unirse a la superficie del cumulus, pero no llegan a penetrarlo (Austin, 1960), indicando que sería necesaria la ocurrencia de la capacitación para que los espermatozoides puedan atravesar el cumulus oophorus. Curiosamente, los espermatozoides que han perdido el capuchón acrosomal, tampoco son capaces de penetrar el

cumulus (Cummins & Yanagimachi, 1986; Talbot, 1985) y solamente lo logran aquellos espermatozoides capacitados que aún retienen sus capuchones acrosomales. Los estudios realizados por Cherr y colaboradores (1986) en el hamster, indicarían que la mayoría de los espermatozoides penetran el cumulus sin haber reaccionado. Una hipótesis sugiere que estos espermatozoides poseen hialuronidasa proveniente del plasma seminal asociada a la superficie de los mismos y que, sería esta enzima, la que ayudaría en el pasaje a través de las células de la granulosa (Talbot, 1985). Otra hipótesis postula que se produciría la liberación parcial de las enzimas acrosomales en forma previa a la vesiculización y que otra serie de enzimas, distintas de la hialuronidasa serían las responsables de la "digestión" de la matriz del cumulus (Farooqui & Srivastava, 1979; Nagae et al., 1986).

I.7.2. Unión y pasaje a través de la zona pellucida

a) Unión a la zona pellucida

En forma previa al pasaje a través de la zona pellucida, los espermatozoides se unen firmemente a la superficie de la misma. La existencia de una interacción entre componentes de superficie del espermatozoide y del ovocito, involucrada en esta fuerte unión, fue postulada por primera vez por Gwatkin y Williams (1977) quienes demostraron que la presencia de zona solubilizada de hamster prevenía la unión de espermatozoides homólogos. Se postuló entonces, que la superficie del espermatozoide poseía receptores para componentes de la zona, los cuales al ser

incubados con dichos componentes, resultaban saturados. Posteriormente, fue demostrada la presencia de proteínas del espermatozoide con alta afinidad para proteínas de la zona pellucida (O'Rand et al., 1985; Sullivan & Bleau, 1985). La naturaleza de las moléculas de la zona responsables de la interacción con el espermatozoide ha sido estudiada con más detalle en el ratón. En esta especie, existirían dos moléculas involucradas en esta unión, la ya mencionada ZP3 (receptor primario), y la ZP2 (receptor secundario), (Wassarman et al., 1985; Bleil & Wassarman, 1986). En esta especie, los espermatozoides intactos interactuarían con ZP3, la cual provocaría en los espermatozoides la ocurrencia de la reacción acrosomal. Una vez reaccionados, los espermatozoides se unirían a la zona pellucida a través del receptor secundario, ZP2 (Wassarman, 1987).

Actualmente, son muy pocos los conocimientos acerca de la naturaleza de los receptores presentes en el espermatozoide. Algunos investigadores sostienen que sacáridos terminales de glicoproteínas (ej. manosa, fucosa, galactosa, N-acetil-D-glucosamina y ácido siálico) tendrían actividad receptora (Ahuja, 1982; 1985; Lambert, 1984). Otros investigadores postulan que proteínas de la membrana plasmática del espermatozoide tendrían actividad receptora (O' Rand, 1985; Sullivan & Bleau, 1985), entre las cuales se incluirían proteínas con capacidad de unión de fucosa (Töpfer-Petersen et al., 1985), con actividad de galactosiltransferasa (Shur & Hall, 1982b; Ahuja, 1985; López et al., 1985), de proteasa (Saling, 1981), o fosforilables en tirosina (Leyton y Saling, 1989a).

El sitio en el cual se localizan los receptores a la zona podría ser diferente según la especie, ya que las estructuras de

La cabeza que hacen contacto con la zona varían entre las mismas. Por ejemplo, mientras en el cobayo tanto los espermatozoides intactos como los reaccionados son capaces de unirse a la zona, (Myles et al., 1987) pudiendo localizarse los receptores tanto en la membrana plasmática de los espermatozoides intactos, como en la acrosomal interna y/o en la membrana plasmática que cubre al segmento ecuatorial de los espermatozoides reaccionados (Huang & Yanagimachi, 1984); en el ratón, sólo los espermatozoides intactos son capaces de unirse a la zona (Saling & Storey, 1979). Por lo tanto, en esta última especie, los receptores a componentes de la zona deberían estar ubicados en la membrana plasmática de los espermatozoides intactos. Sin embargo, de acuerdo a lo descrito por Bleil en el ratón (Bleil & Wassarman, 1986), si bien los receptores para ZP3 se encuentran en la membrana plasmática cubriendo al acrosoma del espermatozoide intacto, los receptores para ZP2 (receptor secundario) se detectan en la membrana acrosomal interna y en el segmento ecuatorial del espermatozoide reaccionado. Estos resultados estarían indicando que, al menos en algunas especies, existiría más de un receptor para los componentes de zona. En el conejo, los receptores cambian su localización con la reacción acrosomal ya que, en los espermatozoides intactos, los mismos se localizan en toda la membrana plasmática de la cabeza y, luego de la reacción acrosomal, su localización se restringe al margen anterior del segmento ecuatorial y región postacrosomal (O'Rand & Fisher, 1987) .

b) *Pasaje a través de la zona pellucida*

Como ha sido mencionado, es imprescindible que los espermatozoides completen la reacción acrosomal para comenzar su pasaje a través de la zona. Durante este pasaje, para el cual resulta esencial que los espermatozoides posean una motilidad vigorosa (Gaddum-Rosse, 1985), los mismos pierden los componentes acrosomales excepto la membrana acrosomal interna y el segmento ecuatorial. Yanagimachi (1988a) propone dos hipótesis que intentan explicar el aún no descifrado mecanismo de penetración de la zona pellucida (Moore & Bedford, 1983; ver discusión en Talbot, 1985). Una de ellas (hipótesis mecánica) sostiene que el espermatozoide se abriría paso a través de la zona en forma independiente de la acción de las enzimas, pudiendo intervenir en este pasaje estructuras descritas en ciertas especies como el *perforatorium*, formado por la membrana acrosomal interna y el material subacrosomal, que se expondrían como consecuencia de la reacción acrosomal. En este caso, el *perforatorium* abriría la zona mecánicamente actuando conjuntamente con los batidos flagelares del espermatozoide.

La segunda hipótesis (hipótesis enzimática) sostiene que cada paso en el pasaje a través de la zona pellucida sería dependiente de la acción de enzimas del contenido acrosomal o superficiales. Esta teoría sostiene que, si bien ciertas enzimas como la hialuronidasa (presente en la superficie del espermatozoide o liberada del contenido acrosomal), podrían ser parcialmente liberadas durante el pasaje a través del cumulus, la mayoría de las enzimas acrosomales serían liberadas sobre la superficie de la zona pellucida (Saling, 1981; Shur & Hall, 1982b). En particular, la acrosina provocaría la hidrólisis de las glicoproteínas de la zona, provocando el "ablandamiento" de la misma (Urch et al., 1985; Dunbar et al., 1985). Parte de la

acrosina, y posiblemente otras enzimas acrosomales, permanecerían unidas a la membrana acrosomal interna y serían las responsables de clivar las moléculas de la zona a medida que la membrana acrosomal interna es empujada contra la zona pellucida por los movimientos vigorosos del espermatozoide.

Ambas teorías tienen puntos fuertes y débiles y, muy probablemente, ambos mecanismos (enzimático y mecánico) contribuyan al evento mencionado. Por un lado, los espermatozoides no podrían penetrar la gruesa zona pellucida si no presentaran una motilidad vigorosa, ya que es necesario que los mismos manifiesten una importante fuerza propulsora para lograr atravesar la zona. Sin embargo, la motilidad por sí sola no sería suficiente para este pasaje. Los componentes acrosomales (incluyendo las enzimas) facilitarían a los espermatozoides el camino. Ciertos componentes acrosomales liberados podrían alterar las moléculas de la zona, provocando el ya mencionado "ablandamiento" de la misma, mientras que otros componentes acrosomales que permanecerían unidos al espermatozoide, podrían clivar activamente las moléculas tanto enzimática como estequiométricamente (Yanagimachi, 1988a).

O'Rand y colaboradores (1986) han propuesto una hipótesis para la interacción de los espermatozoides con la zona pellucida. Según esta hipótesis, se produciría, en primer lugar, una unión de alta afinidad entre componentes de la zona y proteínas del espermatozoide que reconocieran a estos componentes de la zona. Esta primera etapa se continuaría con la degradación y remoción de las moléculas de la zona participantes de esta primera unión, quedando libres las proteínas del espermatozoide y disponibles para interactuar con nuevas moléculas de la zona. Es en este

punto donde juega un papel importante la motilidad, ya que si el espermatozoide no se moviera en forma progresiva, no podría encontrar nuevas moléculas de la zona disponibles para interactuar con él, y no se produciría la penetración.

¿Cual es el tiempo necesario, en condiciones fisiológicas, para que el espermatozoide pueda unirse a la zona y atravesarla? Cuando los ovocitos son recuperados de los oviductos de hembras apareadas, durante el curso de la fertilización, es muy poco probable encontrar espermatozoides sobre o dentro de la zona pellucida. De lo mencionado se deduce que el pasaje a través de la zona resulta ser sumamente rápido (Austin, 1951; Blandau & Odor, 1952). En la rata, Austin (1951) dedujo que este tiempo es de unos pocos minutos. Aparentemente, la velocidad de entrada y pasaje estaría sumamente influenciada tanto por las condiciones fisiológicas de los espermatozoides, ya que los tiempos son muy variables en función del grado de capacitación de los espermatozoides (Yanagimachi, 1969; Yanagimachi & Noda, 1970a); como por las condiciones del medio dado que, aparentemente, los tiempos requeridos bajo condiciones *in vitro* serían mayores que los requeridos *in vivo* (Yang et al., 1972). Al menos en el hamster (Yang et al., 1972), rata (Austin, 1951) y ratón (Motomura & Toyoda, 1980), los espermatozoides capacitados permanecerían muy poco tiempo en o dentro de la zona, en la medida en que el medio en el que se encuentren resulte apropiado.

c) *Especificidad de especie en la interacción con la zona pellucida.*

En los mamíferos, así como la penetración heteróloga puede

ocurrir luego de una inseminación cruzada entre especies cercanas (Maddock & Dawson, 1974; Roldan et al., 1985); entre especies distantes, los espermatozoides no logran unirse ni penetrar la zona heteróloga (Yanagimachi, 1977). La especificidad de especie no parecería residir en la cadena polipeptídica de los receptores ya que, en el ratón, se demostró que el ADN copia (cADN) que codifica para la secuencia aminoacídica de la ZP3 hibridiza con otras especies de mamíferos (Ringuette et al., 1986).

I.8. Fusión del espermatozoide con el ovocito

I.8.1. Sitios de iniciación de la fusión entre el espermatozoide y el ovocito.

Una vez que los espermatozoides han atravesado la zona pellucida, la cabeza cruza el espacio perivitelino, se adosa a la membrana plasmática del ovocito y, finalmente, es gradualmente incorporado al citoplasma del mismo. Austin y Braden (1956) calcularon que, en la rata, los espermatozoides permanecen apoyados en la superficie unos 30 minutos antes de que comience su incorporación al ooplasma. En el hamster (Yanagimachi, 1978) y en el ratón (Sato & Blandau, 1979) el tiempo de permanencia en la superficie del ovocito sería mucho menor que lo hallado para la rata. Si bien originalmente se creía que la región de la cabeza del espermatozoide inicialmente involucrada en la fusión entre ambas membranas era la región postacrosomal (Yanagimachi & Noda, 1970d), posteriormente este concepto fue abandonado. Estudios más profundos de los espermatozoides en contacto con el oolema de

ovocitos rodeados de zona pellucida (intactos) durante el proceso de fertilización, revelaron que es la membrana plasmática que cubre al segmento ecuatorial la que primeramente se fusiona con el ovocito (Bedford et al., 1979; Moore & Bedford, 1983). Es importante destacar nuevamente que esta región sólo adquiere capacidad de fusionarse con el oolema una vez que el espermatozoide ha sufrido la reacción acrosomal (Wolf et al., 1976; Barros y Berrios, 1977; Yanagimachi, 1981; Yanagimachi, 1988a). Los espermatozoides intactos, independientemente de que se encuentren capacitados o no, aún puestos en contacto directo con el oolema, no son capaces de fusionarse al mismo (Yanagimachi & Noda, 1970b; Yanagimachi, 1981).

Tal como ha sido previamente mencionado, la superficie del ovocito presenta numerosas microvellosidades, exceptuando al área sobre el huso meiótico. La fusión con el espermatozoide no ocurre, u ocurre muy raramente en esta región (Johnson et al., 1975; Shalgi & Phillips, 1980ab; Phillips & Shalgi, 1982).

Actualmente no se conoce exactamente si la fusión del espermatozoide se produce en la membrana de las microvellosidades o en el área comprendida entre las microvellosidades. Por un lado, en el hamster ha sido claramente demostrada la participación de las microvellosidades en la fusión entre el espermatozoide y la membrana del ovocito (Yanagimachi & Noda, 1970d, Shalgi & Phillips, 1980a). Por otro lado, Bedford & Cooper (1978) sugirieron que sería la región entre las microvellosidades la que realmente se encontraría involucrada en la fusión. Las observaciones que llevaron a estos autores a postular esta hipótesis consistían en que (1) los ovocitos inmaduros de conejo presentan microvellosidades muy dispersas y sin embargo pueden

fusionarse con los espermatozoides (Berrios & Bedford, 1979) y (2) la membrana plasmática de las microvellosidades intestinales carece de fluidez, pudiendo ser ésta la situación de las presentes en el ovocito. Sin embargo, Yanagimachi (1981) considera que estos argumentos no serían válidos debido a que si bien los ovocitos inmaduros de conejo poseen pocas microvellosidades, la distancia entre las mismas es mucho menor que el largo del espermatozoide. Por lo tanto, sería inevitable que el espermatozoide entrara en contacto con varias microvellosidades, en el momento en que se asocia con la superficie del ovocito. A su vez, al menos en el ratón, hamster y rata, las microvellosidades se encuentran tan densamente distribuidas (Jackowski & Dumont, 1979; Shalgi & Phillips, 1980b) que sería prácticamente imposible que un espermatozoide no hiciera contacto con ellas. Por otro lado, si bien en algunas ocasiones los espermatozoides pueden asociarse a la región libre de microvellosidades que se encuentra sobre el huso meiótico, tal como se ha mencionado, la fusión rara vez ocurre en este área. Finalmente, las microvellosidades del ovocito no serían comparables a aquellas presentes en las células intestinales debido a que estas últimas son estructuras relativamente estacionarias reforzadas por la presencia de microfilamentos, mientras que las del ovocito son estructuras relativamente dinámicas, que pueden desaparecer y reaparecer, sugiriendo una alta "fluidez" de sus membranas. La Fig. I.11 muestra los probables sitios de iniciación de la fusión en el oolema.

A los pocos minutos del contacto inicial del espermatozoide con el oolema, la motilidad del espermatozoide declina abruptamente y el flagelo continúa realizando suaves movimientos vibrátiles

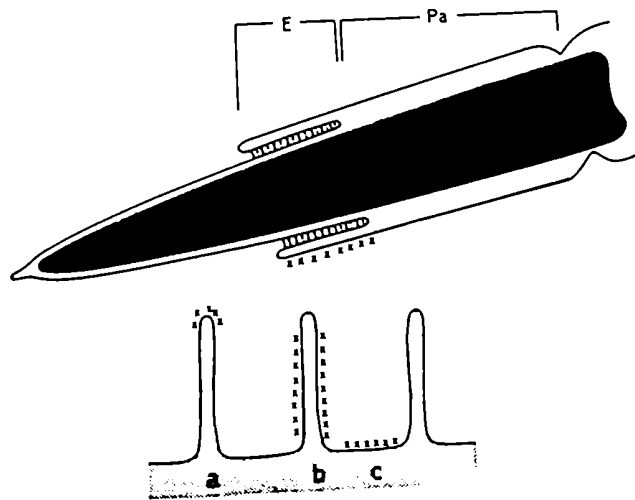


Fig. I.11: Diagrama de los probables sitios de iniciación de la fusión entre el espermatozoide y el oolema. Las áreas marcadas con cruces constituyen los sitios que han sido postulados como regiones de iniciación de la fusión. (E) Segmento ecuatorial, (Pa) región postacrosomal, (a) superficie apical de las microvellosidades, (b) superficie lateral de las microvellosidades, (c) región entre microvellosidades.

durante las horas siguientes en que se produce la incorporación del espermatozoide (Gaddum-Rosse, 1985). A medida que la incorporación progresa, la proporción de la cola que permanece en el exterior disminuye, hasta que finalmente se produce la incorporación total. El mecanismo responsable de la incorporación de la cola actualmente no es completamente conocido (Gaddum-Rosse, 1985).

I.8.2. Motilidad del espermatozoide y fusión

Tal como ha sido mencionado, es necesaria una fuerte motilidad del espermatozoide para atravesar la zona pellucida. Sin embargo, en el caso de la fusión, espermatozoides inmóviles o con muy baja motilidad son capaces de sufrir este proceso en la medida en que hayan sufrido la reacción acrosomal (Yanagimachi, 1981).

Trabajos realizados por Yanagimachi (1981) permitieron demostrar que al tratar espermatozoides móviles y reaccionados de hamster con una concentración baja de formaldehído (0.03%, 5 min), se producía la inmediata inmotilidad de los mismos. Sin embargo, al ser inseminados ovocitos sin zona pellucida con estos espermatozoides, se producía entre un 50% y un 100% de penetración de los mismos al cabo de 1 hora de haber sido inseminados. Por el contrario, al ser utilizada una concentración de formaldehído mayor a 0.7%, la cual provocaba la muerte de los espermatozoides, la fusión no se producía. Estos experimentos permitieron concluir que, si bien la motilidad de los espermatozoides no es necesaria para que se produzca la fusión, es imprescindible que la membrana plasmática de los mismos se encuentre "viva" para poder participar del proceso mencionado.

I.8.3. Especificidad de especie en la fusión

En general, la especificidad de especie de la fusión con el oolema es menos restringida que la penetración de la zona pellucida. Tal es así que, como es bien conocido, los espermatozoides humanos, que normalmente no son capaces de penetrar los ovocitos intactos de hamster, pueden fusionarse con ovocitos de hamster desprovistos de zona pellucida (Yanagimachi et al., 1976). Este ensayo se utiliza actualmente como método de diagnóstico clínico de espermatozoides humanos (Yanagimachi, 1984). Otro ejemplo lo constituyen los espermatozoides de ratón, los cuales normalmente no son capaces de penetrar la zona de los ovocitos de rata, pero logran fusionarse con estos mismos ovocitos al ser liberados de la zona pellucida (Hanada & Chang, 1972; Pavlok, 1979). Sin embargo, estos hechos no deben considerarse como una manifestación de una falta total de especificidad de especie en el proceso de fusión. El ovocito de hamster es un caso único ya que permite la fusión de una gran variedad de espermatozoides heterólogos (Yanagimachi, 1984). El caso opuesto lo constituyen los ovocitos de ratón, los cuales manifiestan una especificidad muy fuerte y sólo pueden ser penetrados por espermatozoides de la misma especie (Yanagimachi, 1984). Inclusive los mismos ovocitos de hamster sin zona poseen cierto grado de especificidad ya que al ser inseminados, en una misma cápsula, con iguales cantidades de espermatozoides provenientes de hamster, cobayo y humanos, el número de espermatozoides de hamster que se encuentra en cada ovocito

siempre es mayor que el que se encuentra de las otras especies (Yanagimachi, 1981).

I.8.4. Efecto de diversos agentes sobre la fusión.

La fusión entre el espermatozoide y el ovocito es dependiente de la temperatura. En el hamster, se ha demostrado que la fusión no ocurre a temperaturas menores o iguales que 10°C (Hirao & Yanagimachi, 1978a). Si bien en estos estudios los espermatozoides podían unirse a la superficie del ovocito, la fusión no ocurría inclusive hasta 17 - 18 hs luego de la inseminación. Una vez que los mismos eran transferidos a 37°C , la fusión comenzaba inmediatamente.

La fusión es también dependiente del pH del medio, ya que el pH ácido inhibe reversiblemente este proceso (Yanagimachi et al., 1980).

En cuanto a la influencia de la composición iónica del medio sobre la fusión, se ha demostrado que el calcio resulta imprescindible para la ocurrencia de este evento (Yanagimachi, 1978b, 1982). Así como ocurre con el efecto de la baja temperatura, en este caso los espermatozoides pueden unirse a la membrana plasmática, pero la fusión no tiene lugar. A diferencia del ión Ca^{2+} , el cual resulta imprescindible para la fusión entre las gametas, el Mg^{2+} resulta beneficioso pero no esencial (Yanagimachi, 1978b) y lo mismo ocurre con el K^{+} en algunas especies como el ratón (Fraser, 1983b). En el cobayo ha sido demostrado que, a diferencia de lo presentado para el ratón, la

presencia de K^+ sería imprescindible para la ocurrencia de la fusión (Rogers et al., 1981), aunque recientemente se ha demostrado que, en este caso, el ión mencionado sería necesario para la adquisición de competencia de fusión por parte de los espermatozoides ya reaccionados, y no para la fusión en sí (Yanagimachi y Bhattacharyya, 1988).

Esta serie de estudios permite demostrar, en general, la existencia de dos etapas involucradas en el proceso de fusión: una primera etapa de unión a la membrana plasmática del ovocito, la cual no sería dependiente de temperatura, pH o calcio, y una segunda etapa de fusión propiamente dicha entre las membranas de ambas gametas.

Finalmente, estudios realizados en el ratón, demostraron que la membrana plasmática del ovocito resulta sensible a la acción de enzimas proteolíticas ya que los porcentajes de fusión de ovocitos liberados de la zona pellucida por tratamiento con pronasa o quimotripsina resultaron menores que los obtenidos con ovocitos a los cuales se les había removido la zona mecánicamente (Boldt & Wolf, 1985). Sin embargo, la membrana del ovocito de hamster resulta ser relativamente resistente a la acción de enzimas proteolíticas (Hirao & Yanagimachi, 1978b) ya que se observó que las mismas no alteran la capacidad de fusión de estos ovocitos.

I.8.5. Modelo hipotético de la secuencia de eventos involucrados en la fusión.

de determinar los eventos de membrana involucrados en la fusión de las gametas y, por lo tanto, los conocimientos actuales acerca de este proceso resultan muy limitados, Yanagimachi (1988b) ha propuesto una hipótesis del mecanismo posible. Según este autor, el espermatozoide y el ovocito poseerían en sus membranas moléculas complementarias. A su vez, el espermatozoide poseería también proteínas de naturaleza fusogénica. Al interactuar el espermatozoide con el oolema, se produciría la interacción entre las moléculas complementarias presentes en cada una de las gametas. Esto permitiría, a su vez, la inserción de las proteínas fusogénicas del espermatozoide en el oolema. Se ha descrito que, para que este fenómeno de inserción tenga lugar, es necesaria la existencia de un potencial de membrana negativo (Jaffe & Cross, 1986) y, teniendo en cuenta que los ovocitos de mamíferos no fertilizados poseen un potencial de membrana con estas características (Jaffe et al., 1983; Miyazaki & Igusa, 1985) la inserción exitosa de las putativas proteínas fusogénicas en el oolema sería posible. Esto provocaría una perturbación en la bicapa lipídica, la cual conjuntamente con la separación de fase de los lípidos de membrana inducida por el ión Ca^{2+} (Papahadjopoulos, 1978; Düzgünes, 1985) desencadenaría la fusión de las dos membranas.

Como consecuencia de la fusión, se produce una combinación entre los componentes de la membrana plasmática del espermatozoide y la del ovocito (Yanagimachi, 1981). Una clara demostración de este fenómeno fue aportada por Gaunt (1983) en la rata, quien, mediante el uso de un anticuerpo monoclonal que

reconoce específicamente un componente de la superficie del espermatozoide, demostró la transferencia de este componente a la membrana de los ovocitos fertilizados (no así a la de los no-fertilizados). Si bien este autor no pudo detectar al antígeno mencionado más allá del estadio de cigota (Gaunt, 1983), existen evidencias a favor de la permanencia de otros antígenos del espermatozoide de rata en la superficie de embriones (Koyama, 1984).

I.9. Eventos posteriores a la fusión

I.9.1. Activación del ovocito.

Una vez producida la fusión entre las gametas, el metabólicamente quiescente ovocito inicia una serie de eventos que culminan en la diferenciación y formación de un nuevo organismo. A esta reactivación de los procesos metabólicos se la conoce con el nombre de *activación*.

Es muy poco lo que se conoce acerca del mecanismo de activación de los ovocitos de mamíferos. En el hamster, entre los 10 a 30 segundos posteriores a la unión del espermatozoide con el oolema, existiría una liberación explosiva de Ca^{2+} intracelular, la cual comienza en el sitio en el cual se produjo la fusión para luego expandirse por todo el ovocito (Miyazaki et al., 1986). Esta liberación se repite a intervalos regulares por espacio de unos 100 minutos y, si bien no se conoce con exactitud la importancia biológica de la naturaleza recurrente de esta liberación, se cree que estaría relacionada con actividades del citoesqueleto. Como consecuencia de la activación, se producen

también cambios en las características fisiológicas y bioquímicas de la membrana (Yamashita, 1982; Jackowski et al., 1988).

Aún no es claro el mecanismo por el cual el espermatozoide desencadena la activación del ovocito. Yanagimachi (1988b), partiendo del modelo propuesto para la fusión (ver sección I.8.5.), propone que el segmento ecuatorial del espermatozoide poseería proteínas específicas, las cuales, al insertarse en el oolema, provocarían una perturbación local de los lípidos de membrana, constituyendo el primer paso en el desencadenamiento de la activación. A su vez, tanto el Ca^{2+} liberado al ooplasma por el espermatozoide, como algunas sustancias del ciclo de fosfoinosítidos, podrían estar involucradas en este proceso (Fulton & Whittingham, 1978; Whitaker & Irvine, 1984).

I.9.2. Liberación de los gránulos corticales y bloqueo de la polispermia.

Fué Austin quien, en 1956, mediante el uso de un microscopio de contraste de fase, no sólo descubrió por primera vez los gránulos corticales en los ovocitos de mamíferos, sino que observó la ocurrencia de una desaparición de los mismos como consecuencia de la fertilización (Austin, 1956). En algunas especies, al producirse la exocitosis de los gránulos corticales, se manifiesta una alteración de las características físicas y químicas de la zona pellucida, la cual se torna "refractaria" a la entrada de nuevos espermatozoides. A este fenómeno se lo ha denominado *reacción de zona* (Austin & Braden, 1956; Wolf, 1981). Esta refractariedad podría estar asociada con una modificación proteolítica de los receptores de zona, por parte de las enzimas

contenidas en los gránulos (Wassarman, 1987).

La reacción de zona no es el único mecanismo por el cual los ovocitos de mamíferos logran un bloqueo a la polispermia. En algunas especies, la membrana plasmática del ovocito posee por sí misma, la capacidad de evitar la entrada de espermatozoides supranumerarios. A este bloqueo de la polispermia a nivel de la membrana plasmática se lo denomina reacción vitelina (Austin & Braden, 1956) o *bloqueo del oolema* (Wolf, 1981). No se conoce la naturaleza del mecanismo por el cual opera este bloqueo. Si bien algunos investigadores han propuesto la participación de material proveniente de los mismos gránulos corticales (Cooper & Bedford, 1971; Gordon et al., 1975), podría existir también un mecanismo de naturaleza eléctrica, tal como ocurre en algunos invertebrados (Jaffe & Gould, 1985). La relativa eficiencia de cada uno de estos bloqueos puede evaluarse determinando el número de espermatozoides que entran en el espacio perivitelino y en el citoplasma del ovocito luego de un apareo o una inseminación artificial (Austin, 1961). Es así que se ha podido determinar que en los ovocitos de hamster, perro, oveja, y ratón de campo, el bloqueo a la polispermia está dado fundamentalmente por la reacción de zona. En el caso del conejo y topo, la situación es inversa ya que aparentemente, los ovocitos fertilizados de estas especies no desarrollan una reacción de zona, sino que evitan el exceso de espermatozoides mediante el desarrollo de un bloqueo vitelino. Finalmente, la rata, ratón, cobayo y gato se encontrarían en una situación intermedia ya que utilizarían parcialmente ambos mecanismos (Yanagimachi, 1988a).

I.9.3. Decondensación del núcleo del espermatozoide en el ooplasma.

Como ha sido mencionado en la sección I.2.2., las protaminas nucleares de los espermatozoides maduros poseen una gran cantidad de puentes disulfuro que le confieren al núcleo una mayor "rigidez", la cual a su vez, resultaría beneficiosa durante el pasaje del espermatozoide a través de la zona pellucida (Bedford, 1983a). Uno de los primeros eventos que ocurre luego de la incorporación del espermatozoide al ooplasma, es la desintegración rápida de la membrana nuclear. Como resultado de esta ruptura, la cromatina queda directamente expuesta a componentes del citoplasma, los cuales alteran su composición (Longo, 1985). En primer lugar, se produce la pérdida de las protaminas, y a pesar de que posteriormente las mismas serán reemplazadas por histonas sintetizadas de novo, existe un período en el cual la cromatina no posee ningún tipo de proteínas asociadas (Rodman et al., 1981). Si bien no es conocida la naturaleza de los componentes citoplasmáticos responsables de la decondensación de la cromatina, resulta probable que este fenómeno se encuentre mediado por agentes reductores de los puentes disulfuro y de las uniones no-covalentes de las proteínas (Wolgemuth, 1983). También ha sido sugerida la participación de proteasas citoplasmáticas en la decondensación (Mumford et al., 1981). Una vez que las protaminas han sido completamente removidas y la decondensación de la cromatina se ha completado, se inicia la síntesis de ADN (Naish et al., 1987).

En la Fig. I.12 se representa la secuencia de eventos desde que el espermatozoide se encuentra en el espacio perivitelino, tras haber atravesado la zona pellucida, hasta ser incorporado al ooplasma.

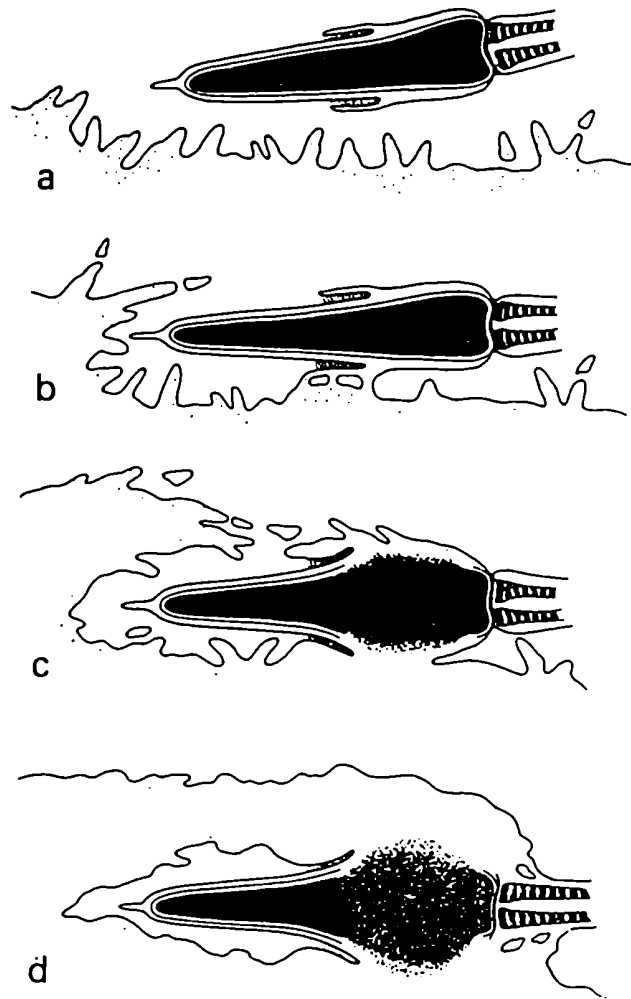


Fig. I.12. Esquema de los sucesivos estadios de fusión e incorporación al ooplasma, de un espermatozoide que ha atravesado la zona pellucida. (a) El espermatozoide que ha atravesado la zona pellucida, y se encuentra en el espacio perivitelino se aproxima al oolema. (b) El espermatozoide se fusiona con el oolema a través del segmento ecuatorial. (c) La membrana nuclear del espermatozoide desaparece y comienza a hacerse evidente la decondensación de la cromatina. (d) Se completa la incorporación de la cabeza del espermatozoide al ooplasma.

I.9.4. Desarrollo y asociación de los pronúcleos masculino y femenino.

Así como una de las consecuencias de la activación del ovocito consiste en la expulsión de los gránulos corticales, una segunda manifestación visible es la continuación de la meiosis del ovocito, la cual, se encontraba arrestada en la etapa de metafase II. Una vez que se produce la expulsión del segundo corpúsculo polar, el grupo de cromosomas resultante de la finalización de la meiosis en el ovocito y el núcleo descondensado del espermatozoide, forman los *pronúcleos* femenino y masculino. Ambos pronúcleos se cubren de una membrana originada probablemente a partir del retículo endoplasmático del ovocito (Longo, 1985). Durante la formación de los pronúcleos, se produce una activa síntesis de ADN (Naish et al., 1987) y, al menos en el ratón, se produce también la síntesis de ARN (Wolgemuth, 1983). De acuerdo a lo descrito por Brandriff y Pedersen (1981), si el ADN del espermatozoide ha sufrido algún daño previo a la fertilización, es durante esta etapa que se puede producir su reparación. Si bien no se conoce la naturaleza de los factores involucrados en la formación de los pronúcleos masculino y femenino, se cree que serían distintos entre sí (Yanagimachi, 1981) y de naturaleza no especie-específica (Yanagimachi, 1981; Wolgemuth, 1983) ya que, por ejemplo, los espermatozoides humanos son capaces de formar pronúcleos de características normales en ovocitos de hamster sin zona pellucida (Yanagimachi, 1984). A su vez, la cantidad disponible de los factores responsables de la formación de los pronúcleos en el ovocito sería limitada, ya que cuando un ovocito es penetrado por numerosos espermatozoides, si bien en todos se produce la decondensación de sus cabezas, sólo en algunos se produce la transformación a pronúcleo (Hirao & Yanagimachi,

1979).

La secuencia morfológica de la migración de los pronúcleos hacia el centro del ovocito fertilizado ha sido extensivamente estudiada tanto a nivel de microscopía óptica (Austin, 1961) como electrónica (Longo, 1985). En esta etapa de migración estarían involucrados elementos del citoesqueleto como microfilamentos y microtúbulos (Schatten et al., 1986). Una vez que los pronúcleos se contactan entre sí se produce la unión de los mismos, proceso conocido con el nombre de *singamia*. Resulta interesante destacar que la singamia no está mediada por la fusión de las membranas de los pronúcleos, sino por una ruptura al azar de las mismas, y una posterior combinación de la cromatina de origen paterno y materno (Longo, 1985).

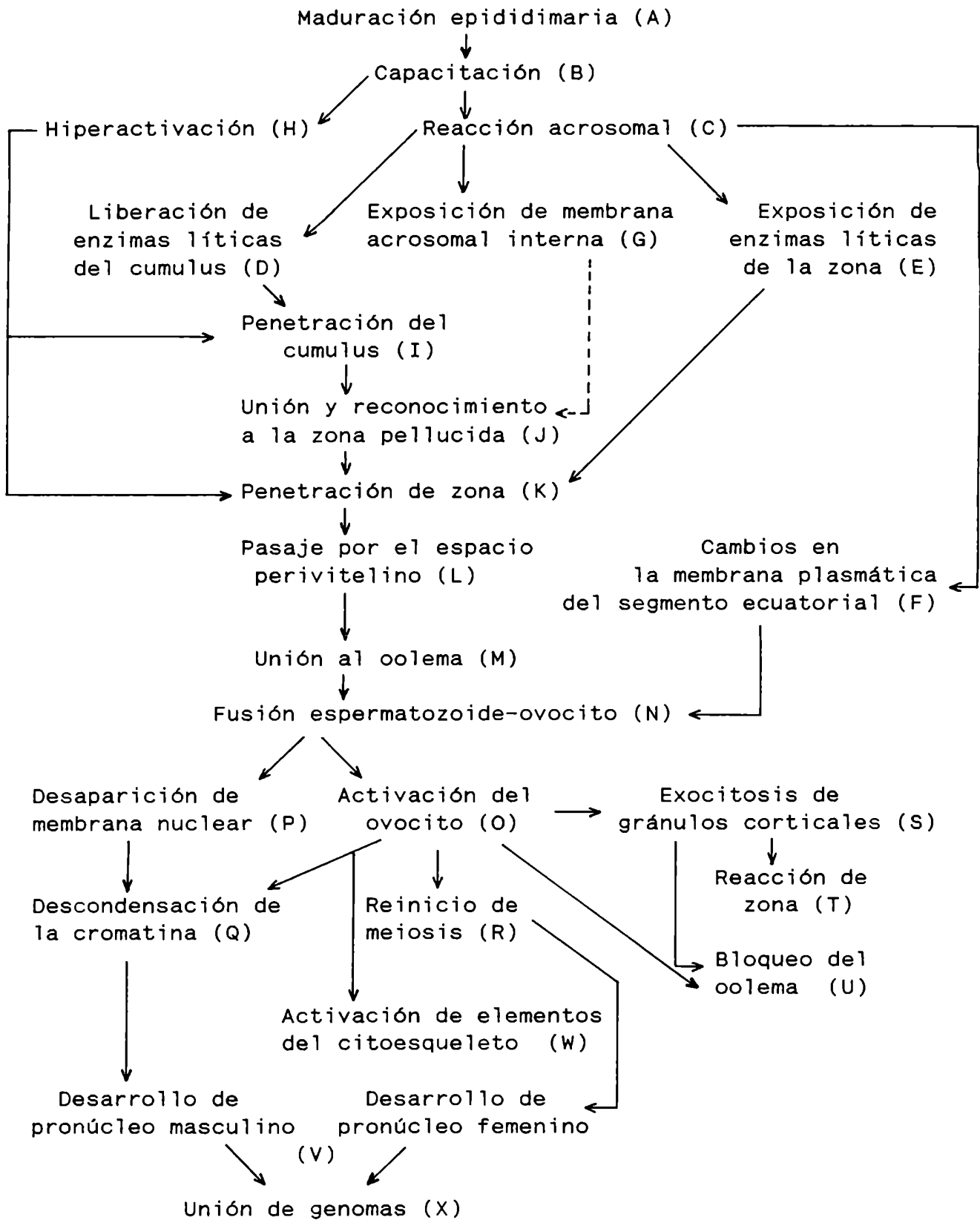
Posteriormente, la cromatina difusa se comienza a organizar en cromosomas distinguibles, y, a partir de microtúbulos sintetizados de novo, se forma el huso de la primera división mitótica dando origen a la *cigota*. La formación de la *cigota* implica que la contribución hereditaria paterna y materna se han acoplado para funcionar conjuntamente. Esta etapa marca, por un lado, el final de la *singamia* (y con ello del proceso de fertilización), y por otro lado, el comienzo del desarrollo de un nuevo organismo.

La Fig. I.13, extraída de Yanagimachi (1981), esquematiza las posibles relaciones entre los eventos más importantes que ocurren antes y durante el proceso de fertilización. Resumiendo lo descrito en este trabajo, los eventos que se suceden serían los siguientes:

Los espermatozoides deben sufrir un proceso de maduración epididimaria (A), y posteriormente de capacitación (B), antes de

adquirir capacidad de sufrir la reacción acrosomal. Cuando el espermatozoide completamente capacitado llega al cumulus oophorus y/o zona pellucida, inicia la reacción acrosomal (C), cuyas consecuencias son: la liberación de enzimas ("lisinas") probablemente involucradas en el pasaje a través del cumulus y/o zona pellucida (D, E), y la modificación del segmento ecuatorial, el cual adquiere características fusogénicas (F). A su vez, permitiría la exposición de la membrana acrosomal interna (G), que sería la región a través de la cual el espermatozoide se une a la zona pellucida en ciertas especies. La hiperactivación (H) adquirida como consecuencia de la capacitación favorecería el pasaje a través del cumulus (I) y zona pellucida. Una vez unidos los espermatozoides a la zona pellucida (J), comienza el pasaje a través de la misma, evento en el cual participarían componentes enzimáticos como mecánicos (K). Una vez que el espermatozoide ha atravesado el espacio perivitelino (L), se une al oolema (M) y comienza la fusión (N), así como la activación del ovocito (O). Inmediatamente después que la cabeza del espermatozoide ingresa al ooplasma, se produce la ruptura de la membrana nuclear (P) y decondensación de la cromatina (Q). A su vez, se produce el reinicio de la meiosis (R). La activación del ovocito provoca la liberación de los gránulos corticales (S), los cuales participarían de la reacción de zona (T) y del bloqueo del oolema (U). Finalmente, se produce la formación de los pronúcleos masculino y femenino (V), los cuales se aproximan como consecuencia de la actividad del citoesqueleto (W), produciéndose la unión de ambos genomas (X).

Fig. I.13. Posibles relaciones entre los eventos que ocurren antes y durante el proceso de fertilización.



I.10. OBJETIVOS

Tal como ha sido mencionado en la Introducción, la adquisición de capacidad fertilizante por parte de los espermatozoides es el resultado de dos procesos consecutivos:

i) un proceso de *maduración*, que ocurre durante el tránsito de los mismos por el conducto epididimario, el cual confiere a los espermatozoides una "potencial" capacidad fertilizante,

ii) un proceso de *capacitación*, que ocurre en el tracto genital femenino durante el transporte de los espermatozoides hacia el sitio de fertilización, el cual permite a los espermatozoides expresar la capacidad fertilizante adquirida durante la maduración.

Bajo condiciones normales *in vivo*, los espermatozoides que no han completado su paso por el epidídimo, son incapaces de participar en el desarrollo a término de un ovocito. Sin embargo, no resulta aún claro si la falta de competencia de los espermatozoides inmaduros es producto de un incorrecto transporte de los mismos en el tracto femenino, de fallas en los eventos previos a la activación de los ovocitos o en la activación misma, o de problemas existentes durante el desarrollo embrionario (Cooper, 1986). A su vez, la incompetencia mencionada de los espermatozoides inmaduros podría deberse a su incapacidad de llevar a cabo uno o varios de los eventos mencionados.

La adquisición de capacidad fertilizante que ocurre durante el proceso de maduración epididimaria, sería resultado de la adquisición de competencia, por parte de los espermatozoides, en las distintas etapas del proceso de fertilización, entre las cuales se incluyen:

a. Desarrollo de la motilidad progresiva

El desarrollo de motilidad progresiva y unidireccional de los espermatozoides resulta de suma importancia para permitir el pasaje de los mismos a través de las dos barreras más restrictivas que se presentan en el tracto de la hembra: el cervix uterino, en los animales con deposición de espermatozoides en la vagina, y la unión útero-tubaria, en los animales con deposición en el útero (Harper, 1988). A su vez, el desarrollo de la capacidad de presentar "motilidad hiperactivada", sería de fundamental importancia para el ascenso de los espermatozoides a la ampulla (Harper, 1988). Finalmente, tal como ha sido mencionado, la adquisición de motilidad resulta imprescindible para la posterior penetración de las envolturas que rodean al ovocito (Yanagimachi, 1988a).

El epidídimo participaría en la provisión y remoción de iones y cofactores que actuarían en, ó cerca del flagelo, facilitando aquellos cambios en la composición intracelular del espermatozoide directamente involucrados en el desarrollo de la motilidad (Cooper, 1986). A su vez, el epidídimo proveería al espermatozoide de factores inhibitorios de la motilidad, los

cuales serían removidos durante la capacitación, permitiendo así que los distintos patrones de motilidad se desarrollen en el momento y lugar adecuados (Cooper, 1986).

b. Desarrollo de capacidad de sufrir la capacitación

Actualmente, no existen evidencias concretas de la participación epididimaria en la adquisición de habilidad, por parte de los espermatozoides, de sufrir el proceso de capacitación. Si bien existen evidencias de una menor capacidad de manifestar eventos vinculados con la capacitación, como lo son la hiperactivación o reacción acrosomal (Cummins, 1976), resulta difícil discriminar si estos resultados son una consecuencia de la inhabilidad de los espermatozoides inmaduros de capacitarse o bien de sufrir las consecuencias de la capacitación en sí.

La vinculación más clara entre la maduración y la capacitación se manifiesta a través de la secreción epididimaria de factores denominados en conjunto "decapacitantes", los cuales poseerían una función estabilizadora o protectora de la membrana del espermatozoide. De este modo, prevendrían la expresión prematura de las capacidades adquiridas por los espermatozoides durante la maduración (Cooper, 1986). En particular, han sido identificados factores decapacitantes involucrados en la reversión de la capacitación (Fraser, 1990) así como también en la inhibición de la reacción acrosomal (Oliphant et al., 1985) debiendo, por lo tanto, ser liberados durante el transporte de los espermatozoides en el tracto femenino y/o en las cercanías del ovocito, para permitir la ocurrencia de los eventos finales de la capacitación y de la reacción acrosomal.

c. Desarrollo de la capacidad de sufrir la reacción acrosomal

Como consecuencia del proceso de maduración epididimaria, los espermatozoides adquieren la capacidad de sufrir la reacción acrosomal (Cooper, 1986; Lakoski et al., 1988). Esta mayor capacidad de sufrir la reacción acrosomal a medida que se produce la maduración, sería consecuencia de la ocurrencia de cambios a nivel de las membranas involucradas, aunque no se conocen exactamente los mecanismos subyacentes a estos cambios (Cooper, 1986). Cabe destacar que, tal como ha sido demostrado recientemente por Lakoski y col (1988), el epidídimo podría estar involucrado no sólo en generar cambios a nivel de las membranas aumentando su capacidad fusogénica, sino también en la modulación de los mecanismos de respuesta a los factores inductores de la reacción acrosomal. En los estudios mencionados, los autores demostraron una correlación entre la modificación de un antígeno de la membrana de los espermatozoides durante la maduración epididimaria, y la aparición de capacidad de respuesta a la inducción de la reacción acrosomal por la zona pellucida. Por el contrario, este cambio no pudo ser correlacionado con la capacidad de sufrir el proceso exocitótico en sí, debido a que el ionóforo era capaz de provocar la reacción acrosomal independientemente de la presencia del antígeno modificado en los espermatozoides.

d. Unión a la zona pellucida

Tal como ha sido demostrado en diversas especies, a medida que los espermatozoides proceden de regiones más distales del epidídimo, aumenta su capacidad de unión a la zona pellucida (Saling, 1982; Orgebin-Crist & Fournier-Delpech, 1982; Cuasnicú et al., 1984c). Los estudios presentados por Saling (1982), permitieron demostrar que el aumento en la capacidad de unión a la zona es un fenómeno independiente de la adquisición de motilidad. Teniendo en cuenta que la interacción de los espermatozoides con la zona pellucida ocurre a nivel de la membrana plasmática de los mismos (al menos en las especies cuyos espermatozoides sufren la reacción acrosomal una vez que se ha producido el contacto con la zona), el aumento en la capacidad de unión a la zona, podría estar vinculado con la adquisición de componentes de origen epididimario. La asociación de estos componentes a la membrana plasmática del espermatozoide debería ser diferente a la de los factores decapacitantes ya que, a diferencia de lo que ocurre con los mismos, los componentes que participan en la interacción con la zona pellucida deben permanecer en la superficie después de finalizada la capacitación.

e. Fusión con el oolema

Durante su pasaje por el epidídimo, los espermatozoides adquieren, tanto la capacidad de unión a la membrana plasmática del ovocito, como la capacidad de fusión a dicha membrana (Pavlok, 1974; Hinrichsen & Blaquier, 1980; Saling, 1982; Dacheaux & Paquignon, 1983). Actualmente no es conocido si la

menor capacidad de fusión de los espermatozoides inmaduros es una consecuencia directa de la menor capacidad de sufrir la reacción acrosomal, o de la no ocurrencia de cambios a nivel de la región del segmento ecuatorial necesarios para la fusión con el ovocito.

De acuerdo a lo mencionado en la Introducción, entre las modificaciones más importantes sufridas por los espermatozoides durante su tránsito por el epidídimo, se encuentra la adquisición de proteínas de origen epididimario. Teniendo en cuenta este fenómeno, conjuntamente con el hecho de que la interacción con el ovocito ocurre fundamentalmente a nivel de la membrana plasmática del espermatozoide, resulta probable que la adquisición de capacidad de interacción y fertilización se encuentren vinculadas a la adquisición de estas proteínas epididimarias. Sin embargo, hasta el momento, son pocos los estudios que han demostrado la participación de proteínas epididimarias en eventos específicos conducentes a la fertilización del ovocito. Entre éstos se incluyen:

i) la inhibición de la fertilidad *in vivo* e *in vitro* provocada por el empleo de anticuerpos contra proteínas de origen epididimario (Moore, 1981; Fournier-Delpech et al., 1983; Cuasnicú et al., 1984a; Sanjurjo et al., 1990)

ii) la adquisición y/o aumento de capacidad fertilizante, así como la aparición de cambios funcionales en los espermatozoides, por adición de proteínas de origen epididimario a espermatozoides inmaduros, entre las cuales se encuentran descriptas las

siguientes hasta el momento:

- una proteína inductora de motilidad progresiva (FMP, Acott & Hoskins, 1981; Acott et al., 1983) que provoca la aparición de movimientos flagelares progresivos en espermatozoides de toro.

- una glicoproteína epididimaria de rata (PES) que aumenta la capacidad de espermatozoides testiculares de interactuar con la zona pellucida (Orgebin-Crist & Fournier-Delpech, 1982).

- proteínas específicas de origen epididimario de hamster que provocan el aumento en la capacidad de reconocimiento a la zona pellucida de ovocitos homólogos (Cuasnicú et al., 1984bc),

- extractos proteicos provenientes de epidídimo de hamster, los cuales aumentan la capacidad fertilizante de espermatozoides inmaduros bajo condiciones tanto *in vivo* como *in vitro* (González Echeverría et al., 1984).

Tal como ha sido mencionado en la Introducción, el proceso de maduración en el epidídimo es un fenómeno de naturaleza andrógeno-dependiente (Orgebin-Crist et al., 1975), fenómeno que ha sido vinculado con la existencia de proteínas epididimarias de síntesis andrógeno-dependiente (Cameo & Blaquier, 1976; Lea et al., 1978; Moore, 1980), cuya interacción con la superficie del espermatozoide ha sido demostrada en varios casos (Olson & Hamilton, 1978; Kohane et al., 1980b; Brooks & Higgins, 1980).

Entre las proteínas sintetizadas por el epidídimo de rata, se encuentra la glicoproteína DE (PM 37.000), uno de los componentes mayoritarios entre las proteínas epididimarias de síntesis andrógeno-dependiente, la cual ha sido aislada, caracterizada y purificada (Garberi et al., 1970). La proteína DE es sintetizada en los segmentos proximales del epidídimo y se asocia a la región dorsal del acrosoma de rata a medida que los mismos descienden por el conducto epididimario (Kohane et al., 1980b; Cameo et al., 1986).

Estudios previos, permitieron evidenciar que, durante incubaciones *in vivo* e *in vitro*, se producía una gran pérdida de la proteína DE (Kohane et al., 1980b). Estos resultados sugirieron la posibilidad de que esta proteína estuviera actuando como un factor decapacitante.

Sin embargo, estudios posteriores realizados por Cameo y colaboradores (1986), utilizando técnicas de microscopía electrónica, revelaron la permanencia de DE en espermatozoides que habían sufrido la reacción acrosomal, lo cual resultaba un indicio de la posible participación de esta proteína en el proceso de fertilización en sí.

Cuando espermatozoides provenientes del cauda epididimario de rata fueron expuestos al anticuerpo policlonal específico contra DE (anti-DE) en forma previa a la inseminación uterina de los mismos, se obtuvo una significativa disminución en el porcentaje de ovocitos fertilizados (Cuasnicú et al., 1984a). Estos resultados apoyaban la posible participación de la proteína DE en la capacidad fertilizante de los espermatozoides, ya fuera como factor decapacitante, en cuyo caso el anticuerpo podía haber

interferido con la liberación de la proteína durante la capacitación, o a través de una función específica en el proceso de fertilización en sí, pudiendo el anticuerpo haber interferido con alguno de los eventos comprendidos en este proceso.

El objetivo general del presente trabajo consistió, por lo tanto en la investigación de la vinculación entre la proteína DE y los procesos de capacitación y fertilización, con el fin de establecer la función de esta proteína en los eventos conducentes a la fertilización del ovocito. A su vez, teniendo en cuenta que la proteína DE se asocia a los espermatozoides a medida que los mismos descienden por el conducto epididimario, se propuso estudiar la posible participación de dicha proteína en el proceso de maduración de los espermatozoides, que ocurre durante el tránsito de los mismos por el epidídimo.

De acuerdo a lo mencionado, los estudios realizados y sus resultados correspondientes se presentarán en dos partes:

Primera Parte

- Estudio del comportamiento de la proteína DE durante el proceso de capacitación de los espermatozoides.

Segunda Parte

- Estudio de la función biológica de la proteína DE en:
 - A. la interacción del espermatozoide con el ovocito
 - B. el proceso de maduración epididimaria

II. Materiales y Métodos

II. MATERIALES Y METODOS

II.1. Animales

Los animales utilizados en estos estudios fueron ratas machos adultos (3 - 12 meses) y hembras tanto prepúberes (26 - 30 días) como adultas (8 - 10 semanas), todos ellos pertenecientes a la cepa Sprague Dawley. Los mismos se mantuvieron en las instalaciones del bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental, bajo un régimen horario de 12 hs de luz y 12 hs de oscuridad, a una temperatura constante de 22 - 24°C y en presencia de alimento y agua *ad libitum*.

II.2. Obtención de espermatozoides epididimarios.

Con la finalidad de obtener espermatozoides epididimarios de ratas adultas, los animales se anestesiaron con éter, y cada epidídimo se extrajo a través de un corte efectuado a nivel de la región escrotal. Los mismos se limpiaron de grasa y sangre, manteniéndose permanentemente humedecidos con solución fisiológica (ClNa 9 gr/l de agua desmineralizada).

Para la delimitación de las distintas regiones epididimarias se utilizó un criterio basado en la delimitación propuesta por Fournier-Delpech et al. (1984). La figura II.1 muestra un epidídimo de rata adulta en el cual se señalan las distintas regiones epididimarias, de acuerdo al criterio utilizado en los estudios que se presentan. Los espermatozoides provenientes de los distintos segmentos del epidídimo se obtuvieron realizando

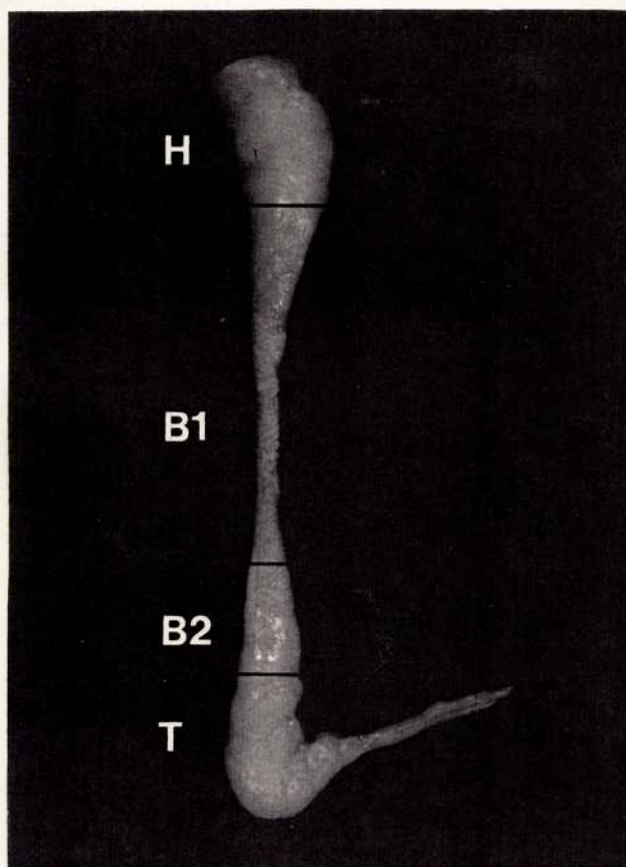


Fig. II.1. Delimitación de las regiones del epidídimo de rata.
H: Caput, B1: Corpus proximal, B2: Corpus distal, T: Cauda

cortes a nivel de los segmentos del caput y corpus, y por punción del túbulo correspondiente a la región del cauda.

II.3. Extracción de proteínas de superficie de espermatozoides provenientes del cauda epididimario.

Para proceder a la extracción de proteínas periféricas de la membrana plasmática de los espermatozoides, se preparó una suspensión de espermatozoides procedentes del cauda epididimario en 2 ml de un medio de lavado suplementado con sacarosa (SWM), mantenido a 37°C. El medio SWM se utiliza para los procedimientos de lavado por centrifugación debido a que, gracias a su contenido de sacarosa y del compuesto de alto peso molecular polivinilalcohol (PVA), mantiene la integridad de las membranas de los espermatozoides durante la centrifugación (Bavister, 1989). La composición del medio SWM se describe en la Tabla II.1.

Luego de producirse la dispersión de los espermatozoides, se realizaron los pasos que se detallan a continuación:

1. Centrifugación de la suspensión, 10 min a 1200 xg.
2. Resuspensión del sedimento de espermatozoides en 1 ml de SWM a 37°C
3. Dos ciclos de lavado como el descrito en el punto 1.
4. Resuspensión del sedimento obtenido del tercer lavado en 1 ml de SWM 0.6 M de NaCl conteniendo una concentración de 0.2 mM del inhibidor de proteasas fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (SWM-PMSF).

Tabla II.1. Medio de lavado con sacarosa (SWM)

Componente	Concentración solución madre		ml/100 ml de solución
	mM	gr/100 ml	
<u>Solución I</u>			
NaCl	157	0,921	91.01
KCl	166	1,237	1.83
CaCl ₂ .2H ₂ O	111	1,766	0.77
MgCl ₂ .6H ₂ O	203	2,436	1.03
Na ₂ HPO ₄	142	2,016	4.50
KH ₂ PO ₄	136	1,830	0.86
<u>Solución II</u>			
sacarosa	300	10,26	100

Para la preparación del medio, un volumen de la solución I fué mezclado con un volumen de la solución II, agregándose PVA hasta 1 mg/ml (concentración final). El medio fue esterilizado por filtración en Millipore 0.22 μ M, siendo mantenido a 4 °C hasta el día de ser utilizado.

5. Incubación de los espermatozoides 45 min a 37°C con leve agitación.
6. Centrifugación 10 min a 1200 xg.

En el sobrenadante obtenido de esta última centrifugación se recuperaron las proteínas de superficie extraídas. Estas muestras se dializaron contra 100 volúmenes de solución tampón Tris 62.5 mM, pH 6.8 durante 24 hs a 4°C.

II.4. Extracción de proteínas totales de membrana de espermatozoides provenientes del cauda epididimario.

El procedimiento seguido para la extracción de las proteínas totales de la membrana plasmática, consistió en una modificación de la técnica descrita por Hamilton y colaboradores (1986) para espermatozoides epididimarios de rata. El mismo consistió en los siguientes pasos:

1. Preparación, en una cápsula de Petri, de una suspensión de espermatozoides en 2 ml de SWM-PMSF.
2. Tres ciclos de lavado por centrifugación (1200 xg, 10 min a temperatura ambiente).
3. Resuspensión del precipitado final en 1.5 ml de Tritón X-100 1% en solución tampón salina de fosfato (PBS: ClNa 8.3 g/l; PO₄HNa₂.7H₂O 1.15 g/l; PO₄H₂K 0.20 g/l) conteniendo 0.2 mM de PMSF (PBS-PMSF), e incubación durante 60 min a temperatura ambiente con agitación continua.
4. Centrifugación a 13000 xg durante 10 min, siendo el sobrenadante transferido a -20°C durante 5 min.

5. Agregado a la muestra de 10 volúmenes de acetona mantenida a -20°C , y posterior agitación vigorosa con Vortex (Thermolyne, Maxi mix, Sybron).
6. Incubación durante 30 min a -20°C con agitación ocasional.
7. Centrifugación de la suspensión durante 10 min a 10000 xg y 0°C .

En el precipitado obtenido quedaron retenidas las proteínas de membrana, siendo el mismo sometido a presión de vacío durante una hora para permitir la evaporación de las trazas de acetona remanentes.

II.5. Extracción de proteínas de membrana removibles y no removibles por alta fuerza iónica en forma secuencial.

Con el fin de proceder a la extracción de proteínas de membrana removibles y no removibles por alta fuerza iónica en forma secuencial, los espermatozoides fueron sometidos, en primer lugar, al tratamiento con alta fuerza iónica con el fin de provocar la liberación primera de las proteínas periféricas. Posteriormente, los mismos espermatozoides fueron tratados con Tritón X-100, liberándose en este segundo paso, las proteínas fuertemente unidas a la membrana.

II.6. Preparación de citosoles de epidídimo y testículo de rata

Para la preparación de citosol de epidídimo de rata, los

epidídimos enteros y testículos, fueron extraídos de animales sacrificados por dislocación cervical, para ser luego dispuestos inmediatamente en una cápsula sobre hielo. Los mismos fueron disgregados en frío, hasta obtener una preparación homogénea de tejido proveniente de cada uno de los órganos mencionados.

Posteriormente, fueron agregados 1.5 volúmenes de una solución Tris 50 mM, pH 7.4 conteniendo 0.2 mM de PMSF, completándose la homogeneización mediante la utilización de un homogeneizador Polytrón (Brinkmann, tres pulsos de 10 segundos con intervalos de 20 segundos entre cada uno de ellos, velocidad 5). Finalmente, la preparación resultante se centrifugó durante 60 min a 105.000 xg y a una temperatura de 4°C, obteniéndose en el sobrenadante la fracción correspondiente al citosol de cada uno de los órganos.

Las fracciones obtenidas se dializaron contra 100 volúmenes de una solución de Tris 50 mM, pH 6.8, utilizándose el procedimiento descrito para la diálisis de las proteínas periféricas de membrana.

La concentración proteica de las muestras se analizó mediante la técnica descrita por Lowry et al. (1951).

La proteína DE utilizada como control fue purificada de acuerdo a la técnica descrita por Garberi et al. (1979).

II.7. Separación electroforética de las muestras

Para realizar la separación electroforética de las muestras obtenidas, se utilizaron geles de poliacrilamida no

desnaturalizantes al 7.5%. La preparación de los geles fue realizada siguiendo la técnica descrita por Hames (1981), la cual consistió en los siguientes pasos:

II.7.1. Preparación de las soluciones madres:

En primer lugar, se procedió a preparar las siguientes soluciones, a partir de las cuales se preparó la mezcla de los geles:

(1.) Acrilamida-bisacrilamida (30:0,8):

Acrilamida: 30 gr
Bisacrilamida: 0,8 gr
Agua: 100 ml.

(2.) Solución de resolución (Tris-HCl 1.5 M, pH 8,8):

Tris-base: 36,3 g
Agua: 80 ml.
El pH se ajusta con HCl 12 N.
Volumen total: 100 ml.

(3.) Solución de concentración (Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8):

Tris-base: 6.0 gr
Agua: 40 ml
El pH se ajusta con HCl 1 N.
Volumen total: 100 ml.

Todas las soluciones fueron esterilizadas mediante filtración en filtros Millipore (0,22 μm), manteniéndose hasta el momento de su utilización a 4°C.

Como catalizadores de la polimerización se utilizaron N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (Temed) sin diluir y Persulfato de amonio 10% en agua.

II.7.2. Armado de los geles:

- Gel separador:

Las distintas soluciones fueron combinadas en las proporciones que figuran en la Tabla II.2, sin el agregado de Temed. A su vez, se armó el dispositivo en el cual se volcó posteriormente la mezcla, para la polimerización del gel. El mismo consistió en un vidrio, una placa de sílica y dos espaciadores de 1.5 mm entre ambos, disponiéndose, una vez armado, en una cámara para geles (Hoeffler).

Una vez desgaseada la mezcla por vacío durante 5 - 10 min, el Temed fue incorporado y, tras una breve agitación, la mezcla se volcó en el espacio comprendido entre el vidrio y la placa de sílica, llegando el volumen hasta 5 cm bajo el borde. Finalmente, fueron agregados en forma muy suave, 0.2 μl de isobutanol, y la polimerización del gel se llevó a cabo durante 1 hora a temperatura ambiente.

- Gel concentrador:

Para proceder a la preparación del gel concentrador, se siguió el mismo procedimiento que el descrito anteriormente,

utilizándose la mezcla descrita en la Tabla II.2. La misma fue agregada sobre el gel de resolución, una vez que el mismo hubo polimerizado, colocándose en forma inmediata un peine de plástico para formar las calles de siembra de la muestra. Una vez polimerizado el gel, el peine fue retirado, procediéndose al montaje del mismo en una cuba para electroforesis (BioRad) acoplada a un sistema de refrigeración con el fin de mantener la temperatura de corrida constante a 4°C.

II.7.3. Condiciones de corrida

Una vez dispuestos los geles en la cuba, se agregó la solución de corrida (Tabla II.2), y se sembraron las muestras conteniendo glicerol 10% y Azul de Bromofenol 10%. La cantidad de proteína sembrada fue de 10 ug para las muestras correspondientes a citosol epididimario, 25 ug para las correspondientes a proteínas de membrana del espermatozoide, 40 ug para las muestras correspondientes a citosol testicular y 1 ug para la proteína DE pura. En el caso de las muestras correspondientes a espermatozoides reaccionados, se sembró la totalidad de las proteínas de membrana (extraídas con Tritón X-100) obtenidas de un total de $2-3 \times 10^7$ espermatozoides no capacitados, y de la misma cantidad de espermatozoides obtenidos por tratamiento con ionóforo A23187 (ver sección II.15.1). La cuba de electroforesis fue conectada a una fuente de alimentación (Pharmacia) y la corrida se realizó bajo condiciones de corriente constante (20 mA por gel).

Tabla II.2. Solución utilizada para la preparación de geles de poliacrilamida no desnaturalizantes.

Solución	Volumen (ml)	
	Gel de resolución (7.5%)	Gel concentrador
(1.) Acri-Bis	10.0	2.5
(2.) Sol. resolución	7.5	
(3.) Sol. concentración	---	5.0
Agua	12.5	10.0
Temed	0.015	0.015
Persulfato de amonio (10% p/v)	0.22	0.22

Solución de corrida:

Tris-base: 3 g

Glicina: 14.4 g

Agua: Hasta 1 litro.

pH 8.3

II.8. Electrotransferencia de las proteínas

Una vez concluida la separación electroforética de las proteínas, las mismas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Sigma, 0.45 μm), de acuerdo a la técnica de Towbin et al. (1979).

Con esta finalidad, los geles y la nitrocelulosa fueron equilibrados en la solución de transferencia (Tris 0.025 M, glicina 0.192 M, metanol 20% v/v, pH 8.3) durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, el gel fue colocado sobre la membrana y sobre cada uno de ellos se dispuso un papel de filtro (Whatman n° 3) y una esponja, ambos previamente humedecidos en la solución de transferencia. Cabe destacar que, teniendo en cuenta que las corridas electroforéticas fueron realizadas en condiciones no desnaturizantes, cada vez que era transferida una muestra de carga desconocida, el gel era dispuesto entre dos hojas de nitrocelulosa.

Todo el dispositivo (esponja-filtro-gel-nitrocelulosa-filtro-esponja) fué ubicado entre los electrodos de una cuba conteniendo 3 litros de la solución tampón, la cual fué conectada a una fuente de alimentación y la transferencia se realizó aplicando un voltaje constante de 35 V por espacio de 16 hs a 4°C.

Una vez concluido el procedimiento, la nitrocelulosa fue separada del gel, el cual a su vez fue sometido a un procedimiento de tinción con plata con el fin de verificar la eficiencia de la transferencia. La tinción fue realizada de acuerdo a la técnica de Merril et al. (1981).

II.8.1. Revelado de la nitrocelulosa

El revelado de las membranas de nitrocelulosa se realizó mediante el procedimiento que se describe a continuación:

1. Bloqueo de la membrana por incubación durante 60 min a temperatura ambiente en una solución de PBS 0.02% Tween 20 (PBST) conteniendo leche en polvo descremada 20 mg/ml.

2. Incubación de la membrana con el anticuerpo policlonal anti-DE 1:200 en solución de bloqueo, utilizando la siguiente secuencia: 30 min a 4°C, 60 min a temperatura ambiente, 30 min a 37°C.
3. Tres lavados de 5 min c/u en PBST.
4. Incubación por 60 min a temperatura ambiente con una solución del anticuerpo anti-conejo acoplado a biotina (Sigma), diluido 1:500 en PBST conteniendo 1 mg/ml de BSA (PBST-BSA 1).
5. Idem 3.
6. Idem 4. con una solución de extravidina-peroxidasa (Sigma) diluida 1:1000 en PBST-BSA 1.
7. Idem 3.
8. Un lavado con Tris 0.1 M, pH 7.5.
9. Reacción con el sustrato diaminobencidina (DAB, Sigma). Incubación de la membrana en la solución del punto 8. conteniendo DAB 50 ug/ml, H₂O₂ 0.01%. La reacción se frenó mediante la transferencia de la membrana de nitrocelulosa a agua.

Las características y preparación del anticuerpo anti-DE han sido previamente descritas por Kohane et al. (1983) siendo 7.3 mg/ml, la concentración del anticuerpo sin diluir.

II.9. Inmunofluorescencia indirecta (IIF) de espermatozoides

La técnica de IIF se realizó tanto en espermatozoides fijados como en aquellos sin previa fijación (*in vivo*). Con el fin de realizar la técnica sobre espermatozoides fijados, los mismos fueron extendidos sobre portaobjetos previamente tratados con poli-L-lisina 0.1 mg/ml (Sigma), los cuales se secaron al aire. Luego de un lavado con PBS, los espermatozoides fueron fijados con p-formaldehído 2% en PBS durante 10 min a temperatura ambiente, seguido de 6 lavados con PBS. En ciertos casos, la fijación fue realizada en suspensión, para lo cual los espermatozoides se incubaron directamente en 10 volúmenes de p-formaldehído 2%, por espacio de 10 min con agitación continua.

Luego de este período, los espermatozoides fueron lavados tres veces por centrifugación y resuspensión en PBS conteniendo 4 mg/ml BSA (PBS-BSA 4), para luego ser dispuestos en forma extendida sobre los portaobjetos cubiertos con poli-L-lisina. Posteriormente, los mismos fueron sometidos al siguiente procedimiento:

1. Bloqueo con suero de cabra normal (SCAN) 5% en PBS durante 30 min a 37°C.
2. Incubación con anti-DE (1:100 en SCAN 1% en PBS) durante 16 hs a 4°C.
3. Tres lavados con PBS de 10 min cada uno.
4. Incubación con un segundo anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a fluoresceína (FITC) (Polysciences, Inc.) diluido 1:100 en PBS-BSA 4, durante 30 min a 37°C.
5. Idem 3.
6. Montaje con glicerol 90% y posterior sellado con esmalte.

Una vez finalizado este procedimiento, los preparados fueron examinados en un microscopio de epifluorescencia (Nikon, Optiphot) utilizando un filtro (B-2A). Las fotografías fueron realizadas utilizando un rollo Ilford HP 400.

En los casos en que se realizó la técnica de IIF sobre espermatozoides *in vivo*, todas las incubaciones y lavados fueron realizadas en suspensión, a 37°C. En ciertos casos, también fue utilizada una temperatura de 4°C durante las incubaciones, con el fin de evitar la formación de fenómenos de agregación ("patching"). El procedimiento, en ambos casos, consistió en los siguientes pasos:

1. Dilución de los espermatozoides con 10 volúmenes de PBS-BSA 4 y lavado por centrifugación (600 xg, 5 min).
2. Resuspensión en 200 ul de una dilución 1:50 de anti-DE en PBS-BSA 4 e incubación durante 30 min a 37°C.
3. Lavado por centrifugación (600 xg, 5 min).
4. Resuspensión en 200 ul del segundo anticuerpo-FITC (1:50 en PBS-BSA 4 e incubación por un período de 20 min).

5. Idem 3.
6. Resuspensión en PBS-BSA 4 y montaje sobre un portaobjetos mantenido a 37°C para ser examinados en el microscopio de epifluorescencia.

En los casos en los cuales se ensayó la presencia de antígenos reconocidos por anti-DE en espermatozoides de otras especies, fueron utilizados espermatozoides humanos eyaculados, y epididimarios de ratón y hamster, siendo estos últimos obtenidos por punción de la región del cauda de epidídimos de animales adultos. En todos los casos, el procedimiento seguido de IIF fue idéntico al descrito para espermatozoides de rata.

II.10. Capacitación in vitro de los espermatozoides

II.10.1. Preparación del medio

El medio utilizado para la recuperación y capacitación de los espermatozoides de rata consistió en una modificación del descrito por Toyoda & Chang (1974) de acuerdo a las indicaciones comunicadas personalmente por la Dra. Shalgi de la Universidad de Tel Aviv. La composición básica del medio, denominado "Medio para la Fertilización de Rata" (RFM, Kaplan & Kraicer, 1978) se muestra en la Tabla II.3.

En aquellos casos en los que fue utilizado el medio Toyoda & Chang original (TCH), el mismo se preparó siguiendo la descripción original, la cual figura en la Tabla II.3.

Para equilibrar el medio y para la posterior capacitación de los espermatozoides, fueron utilizadas placas de cultivo de tejido de 24 hoyos (16 mm, Costar), a las cuales fueron agregados 400 ul de medio por hoyo. Este volumen se cubrió posteriormente con 300 ul de aceite de parafina (Fisher, liviano, viscosidad soybolt 125/135). A su vez, el aceite había sido previamente equilibrado con 1/4 volumen de solución fisiológica a temperatura

Tabla II.3. Composición de los medios utilizados en los ensayos de fertilización in vitro de rata.

Componente	gr / l de solución	
	RFM	TCH*
<u>Solución A</u>		
NaCl	5.137	5.53
KCl	0.38	0.356
CaCl ₂ .2H ₂ O*	0.628	0.25
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.366	0.293
KH ₂ PO ₄	0.202	0.162
HEPES	7.47	--
Rojo fenol	4.00	2.00
<u>Solución B</u>		
NaHCO ₃	14.04	12.94
Rojo fenol	3.00	2.00

HEPES: ácido N-2-hidroxietilpiperazina N'-2-etanosulfónico.

* Para la preparación del medio Toyoda & Chang con alta concentración de calcio (TCh/+Ca²⁺, Gaddum-Rose et al., 1984), se agregaron 0.6 gr de CaCl₂.2H₂O /l de solución A.

Tabla II.3. (continuación)

Las soluciones fueron esterilizadas por pasaje a través de filtros Millipore 0.22 μM y mantenidas fraccionadas a 4 °C. El día del experimento, en todos los casos (RFM, TCh, TCh/+Ca²⁺), se preparó una mezcla de las dos soluciones (A y B) con los siguientes agregados y composición:

Solución A	8.235 ml
Solución B	1.628 ml
Glucosa	10.00 mg
Piruvato de sodio	0.056 mg
Lactato de sodio	0.037 ml
Estreptomicina	0.05 mg
Penicilina-G	0.06 mg
BSA	40.00 mg
	<hr/>
	10.00 ml

ambiente durante 48 hs, con agitación ocasional.

El medio de capacitación fue equilibrado en un incubador (Forma) mantenido a 37°C, conteniendo una atmósfera de 5% CO₂ en aire, hasta la estabilización del pH entre 7.2 - 7.4 (aproximadamente entre 1 - 2 horas).

II.10.2. Obtención e incubación *in vitro* de los espermatozoides

La capacitación *in vitro* de los espermatozoides de rata fue realizada utilizando una modificación de la técnica descrita por Shalgi (1981), cuyos pasos se describen a continuación:

Los espermatozoides fueron recuperados por punción del túbulo de la región epididimaria correspondiente al cauda distal, para luego ser depositados en el fondo de un tubo cónico estéril (Falcon) que había sido previamente seccionado a una altura de 4 cm. Durante el pasaje de los espermatozoides al mismo, el tubo permaneció sumergido en un baño térmico a una temperatura de 37°C. Inmediatamente después, los espermatozoides fueron cubiertos cuidadosamente con 2 ml de medio RFM equilibrado y mantenido a 37°C, para ser posteriormente transferidos al incubador por espacio de 15 min. Solamente fueron utilizados aquellas suspensiones que, al cabo del período mencionado, poseyeran una concentración mayor que 5×10^6 esp/ml en los 100 μ l superiores de la misma. En caso contrario, se procedió a preparar una nueva suspensión proveniente de un nuevo macho.

La concentración de espermatozoides se determinó mediante la utilización de un hemocitómetro.

Una vez transcurridos los 15 min, se tomó un volumen de espermatozoides provenientes de la capa superior del tubo para ser inseminado en los hoyos de capacitación, de modo que la concentración final de los mismos resultara entre 0.5 y 1×10^6 esp/ml. Los mismos fueron mantenidos en el incubador por un período de 5 hs bajo las condiciones atmosféricas y de temperatura mencionadas.

En aquellos casos en los cuales se intentó ensayar la fertilización *in vitro* con espermatozoides eyaculados, los mismos fueron obtenidos mediante el apareo de machos adultos con hembras en estro en un cuarto oscuro. Se utilizó una luz roja para observar el comportamiento del macho y determinar así el momento en que se producía la eyaculación.

A los 30 min de producirse la misma, las hembras fueron sacrificadas, siendo expuestos sus cuernos uterinos con el fin de extraer los espermatozoides eyaculados mediante el empleo de una jeringa estéril de tuberculina sin aguja. Una vez extraídos los mismos, se siguió el procedimiento descrito para los espermatozoides epididimarios.

II.10.3. Evaluación de motilidad y viabilidad de los espermatozoides

Con el fin de evaluar la motilidad de los espermatozoides, se tomaron alícuotas de 10 μ l, las cuales fueron dispuestas sobre portaobjetos mantenidos a 37°C, depositándose sobre los mismos un cubreobjetos mantenido también a la temperatura mencionada. El porcentaje de motilidad se evaluó por microscopía óptica

utilizando un aumento de 400 x, y siendo el mismo calculado como:

$$\frac{\text{número de espermatozoides móviles}}{\text{número de espermatozoides totales observados}}$$

A su vez, para evaluar el porcentaje de viabilidad de las muestras, se tomaron alícuotas de 10 ul, las cuales se agregaron a 40 ul de una solución de 0.5% de eosina alcohólica (Sigma) en solución fisiológica mantenida a 37°C. En forma inmediata, los espermatozoides fueron depositados en un portaobjetos siguiendo el procedimiento descrito en el paso anterior. Mientras que aquellos espermatozoides que presentaban sus membranas dañadas incorporaban la eosina adquiriendo un tono rojizo, los que se encontraban con las membranas íntegras permanecían sin colorearse y, por lo tanto, el porcentaje de viabilidad fué calculado como:

$$\frac{\text{número de espermatozoides no coloreados móviles}}{\text{número de espermatozoides totales observados}}$$

En todos los casos se evaluó un mínimo de 100 células por determinación.

II.10.4. Incubación de los espermatozoides a 4 °C.

Los espermatozoides provenientes del cauda epididimario fueron recuperados de acuerdo a lo descrito en el punto II.10.2., desarrollándose la incubación por espacio de 5 hs en un recipiente hermético conteniendo una atmósfera de 5% CO₂ en aire, mantenido a 4°C.

II.11. Análisis de la proteína DE presente en espermatozoides por enzimo-inmuno ensayo (ELISA).

En una primera serie de estudios se procedió a estandarizar las condiciones del ensayo de ELISA, para lo cual fueron utilizados espermatozoides no capacitados, provenientes de la región del cauda epididimario. Las distintas condiciones ensayadas incluyeron:

- la concentración de la suspensión de espermatozoides a acoplar a la placa.
- el tipo de fijación de los espermatozoides
- la dilución del anticuerpo anti-DE

Con esta finalidad, fueron preparadas suspensiones conteniendo distintas concentraciones de espermatozoides (1×10^6 - 1×10^4 espermatozoides/ml) en PBS a 37°C, luego de lo cual se procedió a realizar la fijación de los mismos. Fueron utilizados dos métodos alternativos de fijación: p-formaldehído 2% en PBS o glutaraldehído 2% en PBS. En ambos casos el procedimiento fue similar y consistió en los siguientes pasos:

1. Incubación de los espermatozoides en 10 volúmenes de fijador, durante 30 min a temperatura ambiente con agitación continua.
2. Tres lavados por centrifugación en PBS.
3. Resuspensión de los espermatozoides en la solución de acople carbonato/bicarbonato, pH 9.3, en una concentración de

1×10^7 esp/ml. Las concentraciones menores se obtuvieron por dilución con la solución de acople.

En todos los casos mencionados, alícuotas de 50 μ l de la suspensión de espermatozoides a analizar fueron dispuestas en los hoyos de placas de ELISA (Nunc-Immuno Plate F96), incubándose durante 16 hs a 4°C. Una vez concluido el período mencionado, tras descartar los espermatozoides que no resultaron adsorbidos a las placas, se efectuaron los pasos que se describen a continuación:

1. Tres lavados con una solución de PBS conteniendo Tween 20 0.02% (PBST).
2. Bloqueo con PBST conteniendo BSA 10 mg/ml (PBST-BSA 10), 120 min, a temperatura ambiente.
3. Incubación con anti-DE, siendo las diluciones ensayadas de 1:100, 1:1.000 y 1:10.000 en PBS-BSA 0.1% (PBS-BSA 1).
4. Idem 1.
5. Incubación con anti-IgG de conejo biotinilado, (1:500 en PBS-BSA 1, 90 min a temperatura ambiente.
6. Idem 1.
7. Incubación con Extravidina-fosfatasa (Sigma, 1:1000 en PBS-BSA 1)
8. Idem 1.
9. Reacción con el sustrato p-nitrofenilfosfato (Sigma 104) 1 mg/ml en una solución dietanolamina 1 M pH 9.8, a la cual se agregó Cl_2Mg 0.5 mM.
10. La reacción se detuvo al virar la mezcla de reacción a color amarillo, por agregado de 100 μ l de NaOH 1 N.

La medición del producto de reacción se realizó en un lector de ELISA (Metrolab) utilizando una longitud de onda de 405 nm.

Los resultados indicaron que las condiciones óptimas de medición se obtuvieron al utilizar una suspensión de espermatozoides con una concentración de 1×10^6 células/ml, fijadas con glutaraldehído, y empleando una dilución de anti-DE de 1:100.

Una vez estandarizadas las condiciones del ensayo, se procedió a realizar un análisis comparativo de la proteína DE presente en espermatozoides no capacitados, capacitados por espacio de 5 hs, así como también en espermatozoides reaccionados por tratamiento con ionóforo A23187. En este último caso, se incubaron espermatozoides bajo condiciones capacitantes *in vitro* por espacio de 4 hs, luego de lo cual fueron tratados con el ionóforo A23187 (5 μ M), siendo utilizado el esquema experimental descrito en el punto II.15.1.

II.12. Ensayos de migración y exposición de la proteína DE.

En aquellos experimentos en los cuales se intentó demostrar la migración de DE, se estudió, en primer lugar, la dilución del anticuerpo anti-DE que marcaba efectivamente a los espermatozoides en suspensión, pero que con un lavado era removido del medio de incubación (de modo que no generara marca fluorescente sobre los espermatozoides luego de ser los mismos incubados con el segundo anticuerpo-FITC). La finalidad del lavado consistía en permitir la capacitación de los espermatozoides en un medio libre de anticuerpo. Por lo tanto,

para la realización de estos ensayos preliminares, se procedió a incubar a los espermatozoides por espacio de 20 min con distintas diluciones de anti-DE (1:5; 1:10; 1:50; 1:100) en medio SWM los cuales, luego de un paso de lavado por centrifugación, fueron resuspendidos en medio de capacitación libre de anticuerpo. Estos mismos espermatozoides fueron centrifugados nuevamente, y el sobrenadante obtenido fue utilizado como primer anticuerpo en una IIF, verificándose así cuál era la concentración de anticuerpo que podía ser removido del medio de incubación con un único paso de lavado.

La dilución adecuada resultó ser de 1:10, siendo por lo tanto la utilizada en el esquema experimental descrito.

Una vez establecida la dilución de anticuerpo a utilizar, se procedió a incubar espermatozoides recuperados del cauda epididimario en medio SWM conteniendo anti-DE (1:10) durante 20 min. Luego de este período, los espermatozoides fueron lavados y resuspendidos en 500 μ l de RFM previamente equilibrado y mantenido a 37°C. Esta suspensión de espermatozoides fue depositada en los hoyos de capacitación y la incubación prosiguió bajo las condiciones descritas. Luego de 5 horas, los espermatozoides capacitados fueron recuperados, fijados y sometidos a la técnica de IIF incubándose sólo con el segundo anticuerpo fluoresceinado. Se evaluó finalmente el porcentaje de espermatozoides que mostraban a la proteína DE localizada en el segmento ecuatorial.

Para el estudio de la posible existencia de un fenómeno de exposición de DE, los espermatozoides fueron incubados al inicio de la capacitación con anti-DE (1:10), de acuerdo al esquema

descrito para el estudio de la migración, para ser posteriormente lavados por centrifugación e incubados con el segundo anticuerpo (1:20 en SWM) durante 20 min. Tras un nuevo paso de lavado para remover el exceso de segundo anticuerpo, los espermatozoides fueron capacitados durante 5 hs, período luego del cual fueron fijados y tratados nuevamente con anti-DE y el segundo anticuerpo-FITC utilizando la metodología descrita para la IIF. Finalmente, se evaluó el porcentaje de espermatozoides con la proteína DE localizada en el segmento ecuatorial.

II.13. Tratamiento con proteasas y agentes permeabilizantes.

Con la finalidad de estudiar el efecto de diversas proteasas sobre la localización de la proteína DE, se preparó una suspensión de espermatozoides provenientes del cauda epididimario en 2 ml de PBS a 37°C y, una vez producida la dispersión de los mismos, fueron tomadas alícuotas (10 - 20 μ l) para ser agregadas a gotas conteniendo 2 mg/ml de tripsina o pronasa en PBS (concentración final: 5×10^5 esp/ml). Luego de un período de 30 min a 37°C, los espermatozoides fueron recuperados, lavados dos veces por centrifugación en PBS-BSA 4, y finalmente fijados y sometidos a la técnica de IIF.

Para lograr la permeabilización de los espermatozoides, fueron utilizados tres métodos alternativos:

i) fijación con metanol-acetona:

Los espermatozoides dispuestos en extendidos se fijaron con metanol a -20°C por 5 min para ser luego transferidos a acetona

mantenida a la misma temperatura por 2 min. Finalmente fueron secados brevemente al aire y lavados con PBS.

ii) tratamiento con Tritón X-100:

Los espermatozoides se fijaron con p-formaldehído 2% para ser luego lavados y sumergidos en Tritón 0.5% en PBS por 5 min.

iii) congelamiento:

Los espermatozoides fueron dispuestos en portaobjetos con poli-L-lisina, cubriéndose con un cubreobjetos y siendo inmediatamente congelados a -20°C . Aún congelados, fue removido el cubreobjetos, y el portaobjetos conteniendo los espermatozoides fue sumergido en 2% p-formaldehído.

En todos estos casos, luego de ser extensamente lavados con PBS, los espermatozoides fueron sometidos a la técnica de IIF.

II.14. Incubación en ausencia de los iones calcio y bicarbonato.

En aquellos casos en los cuales se intentó determinar el efecto de la ausencia del ión Ca^{2+} sobre la ocurrencia de la redistribución, los espermatozoides fueron incubados por 5 hs bajo condiciones capacitantes, en un medio RFM preparado omitiendo el agregado de Cl_2Ca al mismo. Estrictamente hablando, este medio no fue considerado "libre de calcio", ya que podían existir aún trazas de este ión en la solución.

En los ensayos en los cuales se estudió el efecto de la

ausencia de HCO_3^- en el medio de capacitación sobre la redistribución, el procedimiento utilizado fue similar al caso anterior. Teniendo en cuenta que el HCO_3^- es utilizado para mantener el pH del medio en una atmósfera conteniendo CO_2 , el pH del medio se llevó a un valor de 7.4 (por titulación con NaOH 1 N) en forma previa al agregado de los espermatozoides, llevando a cabo la incubación en una estufa mantenida a 37°C sin suplemento de CO_2 .

En ambos casos, ausencia de Ca^{2+} o HCO_3^- , el medio fue suplementado con NaCl para mantener la osmolalidad del mismo.

La evaluación de la capacidad de penetración de los espermatozoides incubados en un medio libre de HCO_3^- , se realizó utilizando el ensayo de fusión *in vitro* descrito en la sección II.18.2.

II.15. Efecto de distintos tratamientos inductores de la reacción acrosomal sobre la localización de DE.

II.15.1. Tratamiento con el ionóforo de Ca^{2+} A23187.

Para evaluar el efecto del ionóforo de calcio A23187 sobre la migración de DE, se procedió a capacitar espermatozoides *in vitro* por espacio de 4 hs, luego de lo cual los mismos fueron incubados en presencia de diferentes concentraciones de A23187. Para ello, alícuotas de una solución madre 10 mM A23187 en dimetil-sulfóxido (DMSO), las cuales habían sido previamente mantenidas a -20°C en oscuridad, fueron descongeladas en el momento de ser utilizadas,

y diluidas en RFM hasta una concentración de 0.1 mM. Distintos volúmenes de esta última dilución fueron agregados a los espermatozoides, de modo de obtener las concentraciones deseadas.

Con el fin de remover el ionóforo, una vez que hubiera ejercido su efecto, 15 min después de su agregado, los espermatozoides fueron lavados y resuspendidos en medio RFM conteniendo una concentración de albúmina de 8 mg/ml. La incubación continuó por espacio de una hora adicional, a 37°C en 5% CO₂ en aire. Como control, fue agregado medio RFM ó DMSO.

II.15.2. Tratamiento con ciclos de congelamiento y descongelamiento.

Con el fin de evaluar el efecto del congelamiento seguido de descongelamiento sobre la localización de DE, extendidos de espermatozoides obtenidos del cauda epididimario fueron congelados por transferencia a -20°C durante 10 min, siendo inmediatamente descongelados por incubación en un baño térmico a 37°C. Luego de la repetición de este ciclo, los espermatozoides fueron fijados y sometidos a la técnica de IIF descripta.

II.15.3. Tratamiento con zona pellucida

- i) Desarrollo de un sistema de IIF para números pequeños de espermatozoides.

Como se describirá en el próximo punto, para evaluar el efecto

de la zona pellucida sobre la redistribución de DE, se procedió a incubar una muestra de espermatozoides capacitados con distintas concentraciones de zonas solubilizadas. Teniendo en cuenta que, para una determinada concentración de zonas, el número de las mismas a utilizar dependía del volumen de la muestra de espermatozoides y, a su vez, que el número de zonas obtenidas resultaba un factor limitante para la realización de los experimentos, se desarrolló, en primer lugar, un sistema que permitiera realizar la técnica de IIF sobre números pequeños de espermatozoides. Dado que, aún en presencia de poli-L-lisina, los espermatozoides capacitados se desprendían muy fácilmente de los portaobjetos, no era posible preparar extendidos en portaobjetos con pocos espermatozoides.

Por lo tanto, tomando como base la metodología descrita por Morales & Cross (1989), se procedió a adsorber pequeñas alícuotas de espermatozoides fijados a distintos tipos de membranas, mediante el empleo de un dispositivo manifold operado por vacío (minifold, Schleicher & Schuell), con el fin de realizar sobre las mismas la técnica de IIF.

Las membranas ensayadas fueron HA 0.45 μm , Millipore; nitrocelulosa 0.45 μm , Sigma y policarbonato 0.4 μm , Nucleopore, las cuales fueron primeramente humedecidas con una solución de PBS conteniendo 5% de BSA. Posteriormente las membranas fueron dispuestas en el manifold, para proceder a la recolección de los espermatozoides en las mismas, mediante aplicación de vacío. Una vez concluido este proceso, las membranas fueron retiradas del dispositivo y dispuestas en vidrios de reloj conteniendo la solución de bloqueo. Se ensayaron distintos bloqueos (SCAN 5%, BSA 5%; SCAN 1% en PBS-BSA 4) para cada tipo de membrana, con la finalidad de elegir aquella combinación membrana/bloqueo que, sin

alterar la morfología de los espermatozoides, permitiera la mejor visualización de la marca fluorescente. La técnica de IIF fué realizada por pasajes sucesivos de las membranas a través de vidrios de reloj conteniendo las distintas soluciones de anticuerpos y medios de lavado. Entre todas las combinaciones ensayadas, la membrana de policarbonato y un posterior bloqueo con SCAN 5% resultó la mas adecuada.

- ii) Desarrollo de la técnica para la purificación de zonas pellucidas.

La obtención de zonas pellucidas de ovocitos de rata se realizó a partir de ovarios de hembras prepúberes superovuladas y adultas, los cuales fueron disgregados mecánicamente para ser sometidos a dos métodos de separación alternativos:

- a) Separación en gradientes de Percoll
- b) Filtración a través de mallas de poro decreciente

- a) Separación en gradientes de Percoll:

En este caso, los ovarios fueron obtenidos a partir de hembras adultas, para ser disgregados mecánicamente mediante la utilización de un homogeneizador de vidrio Duall n° 23. La purificación de zonas a partir del tejido ovárico se realizó mediante la separación del mismo en gradientes de Percoll, siguiendo la técnica descrita por Bleil & Wassarman (1986). La fracción del gradiente conteniendo las zonas fue recuperada, siendo contabilizado el número de zonas obtenidas.

b) Filtración a través de mallas de poro decreciente:

La técnica utilizada en este caso consistió en una modificación de la descrita por Oikawa y colaboradores (1988), la cual fue originalmente empleada para la obtención de zonas pellucidas de hamster y, por lo tanto, fue modificada adaptando el poro de malla utilizado y el medio de obtención, para la recuperación de zonas de rata.

El medio utilizado para la extracción (medio ZP) consistió en una solución de PBS conteniendo 1 mg/ml PVA, 0.1 μ M PMSF y 2% citrato de sodio; el cual fue esterilizado por pasaje a través de filtros Millipore (0.22 μ m), manteniéndose a 4°C hasta el día del experimento. Los ovarios utilizados fueron extraídos de hembras adultas o prepúberes superovuladas, los cuales se mantuvieron congelados a -20°C.

El primer paso consistió en la ruptura mecánica y disgregación de los ovarios contra una malla de nylon (212 μ m), utilizando para ello el fondo de un tubo de ensayo de vidrio. En forma permanente, la malla fue lavada por pasaje de medio ZP, con la finalidad de permitir la filtración de las zonas a medida que se producía su desprendimiento de los folículos. Una vez completada la disgregación, se realizó un segundo paso de filtración del eluido obtenido por pasaje a través de una malla de nylon de 48 μ m. En este paso, las zonas quedaron retenidas, filtrándose en cambio las células contaminantes, entre ellas las de la granulosa y glóbulos rojos.

La malla conteniendo las zonas fue transferida a un vaso de precipitado, siendo lavada con medio ZP de modo de permitir el desprendimiento de las mismas. Posteriormente se tomó una alícuota del medio conteniendo las zonas, con la finalidad de

contabilizar el número de zonas recuperadas.

Tanto las zonas obtenidas por gradientes de Percoll como las recuperadas por filtración fueron solubilizadas por agregado de HCl 12 N hasta obtener un pH de 2.5. Luego de 5 min, el pH fue neutralizado por agregado de NaOH 1 N, realizándose una centrifugación a 2000 xg durante 10 min con la finalidad de descartar en el precipitado todo el material particulado que aún estuviera presente junto a las zonas.

En ambos casos, el sobrenadante obtenido se sometió a un proceso de diálisis contra 100 volúmenes de agua desmineralizada (24 hs a 4°C), y posterior liofilización durante un período de 16 hs. Una vez concluido este proceso, el material obtenido se resuspendió en RFM obteniéndose una concentración final de 10 zonas/ul.

iii) Incubación de los espermatozoides con las zonas pellucidas solubilizadas.

Con la finalidad de evaluar el efecto de las zonas pellucidas sobre la redistribución de DE, los espermatozoides fueron incubados bajo condiciones capacitantes por espacio de 3 o 4 horas, luego de lo cual 1 volumen de 10 ul de medio conteniendo los espermatozoides fue transferido a tubos (Eppendorf) conteniendo el mismo volumen de zonas. Como control se utilizó medio ZP sometido al mismo procedimiento que las zonas pellucidas (acidificación, neutralización, diálisis y liofilización) .

Luego de una hora de incubación bajo condiciones capacitantes, los espermatozoides fueron fijados por agregado de un volumen

similar de p-formaldehído 2% durante 10 min, para ser posteriormente recogidos en membranas de policarbonato, realizándose la técnica de IIF adaptada para números pequeños de espermatozoides.

Una vez finalizado este procedimiento, las membranas conteniendo los espermatozoides fueron transferidas a portaobjetos, sobre los cuales se colocaron cubreobjetos conteniendo una gota de glicerol 90% en PBS, y se examinaron bajo el microscopio de epifluorescencia.

II.16. Capacitación de los espermatozoides in vivo.

II.16.1. Superovulación de las hembras

Los ovocitos ovulados fueron obtenidos a partir de hembras prepúberes, superovuladas mediante la administración intraperitoneal de 20 UI de suero de yegua preñada (PMSG, Sigma), seguida de la administración en forma subcutánea de 25 UI de gonadotropina coriónica humana (hCG, Sigma) 48 hs más tarde. Este sistema permitió recuperar entre 20 y 30 ovocitos por hembra. Cabe mencionar que los ovocitos provenientes de hembras inmaduras superovuladas no presentan diferencias en su penetrabilidad y posterior capacidad de desarrollo, con respecto a aquellos recuperados de hembras sexualmente maduras (Toyoda & Chang, 1974).

II.16.2. Sistema de inseminación artificial uterina.

Las inseminaciones *in vivo* fueron realizadas siguiendo la técnica empleada por Lubicz-Nawrocki (1970). Con esta finalidad, las hembras fueron superovuladas utilizando el esquema descripto y, 12 hs post-hCG, fueron anestesiadas con éter y sus úteros expuestos a través de una incisión medio-ventral. Se preparó una suspensión de espermatozoides provenientes de la región del cauda epididimario de machos adultos en medio BMOC (Brinster, 1965) a 37°C, con una concentración de aproximadamente 1×10^7 esp/ml. La composición del medio BMOC se describe en la Tabla II.4.

Los espermatozoides fueron inyectados en un volumen de 0.1 - 0.2 ml dentro de la porción caudal de cada cuerno uterino, siendo utilizada con esta finalidad una jeringa de tuberculina de 1 ml acoplada a una aguja n°25. Con el fin de evitar la pérdida de los espermatozoides inseminados, se efectuaron ligaduras en la base de los cuernos uterinos, las cuales fueron cerradas fuertemente luego de la introducción de los mismos. Para evaluar los porcentajes de fertilidad obtenidos, las hembras fueron sacrificadas y sus oviductos extraídos con el fin de recuperar los ovocitos, tras un período de 36 hs luego del apareo. La recuperación mencionada se realizó por perfusión con solución fisiológica a través del ostium del oviducto, utilizando para ello una aguja n°30 (Hamilton). Posteriormente, se analizó el porcentaje de fertilización obtenido.

II.16.3. Sistema de apareo.

Para la realización de apareos con hembras prepúberes, las mismas fueron superovuladas mediante el procedimiento descripto,

Tabla II.4. Composición del medio BMOC

Componente	Concentración (gr/l)
NaCl	5.10
KCl	0.345
CaCl ₂	0.189
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.293
KH ₂ PO ₄	0.269
NaHCO ₃	1.982
Acido pirúvico	0.035
Acido láctico	3.58 ml
Rojo fenol	0.02

La solución fue esterilizada por pasaje a través de filtros Millipore 0.22 μ M, manteniéndose fraccionada a 4°C. El día del experimento fueron agregados: glucosa, 1 mg/ml y BSA, 5 mg/ml.

inyectándose la hCG entre las 3 y 1 hs previas al comienzo del período de oscuridad del bioterio. En el momento previsto de ovulación (12 hs post-hCG), estas hembras fueron dispuestas en jaulas conteniendo machos adultos, con agua y alimento balanceado *ad libitum*. El sistema fue de apareo monogámico (1 hembra/macho) con excepción de aquellos experimentos en los que se estudió el resultado de apareos de 2 hembras/macho. Al igual que en el caso de las inseminaciones uterinas, los resultados fueron analizados 36 hs luego de producirse el apareo.

II.17. Recuperación de espermatozoides y ovocitos luego de la capacitación in vivo.

Con el fin de obtener espermatozoides luego de un proceso de capacitación *in vivo*, hembras prepúberes fueron inseminadas o apareadas de acuerdo al esquema descrito en el punto anterior y 6 - 7 hs post-inseminación o eyaculación se procedió a la recuperación de los espermatozoides del oviducto.

Para la recuperación de espermatozoides del oviducto tanto libres como asociados al cumulus oophorus, los oviductos fueron perfundidos con medio BMOC a 37°C. En todos aquellos casos en que fue posible, se determinó la motilidad de los espermatozoides obtenidos.

Con el fin de obtener ovocitos con espermatozoides en el espacio perivitelino, hembras prepúberes previamente superovuladas fueron apareadas, recuperándose los cumulus por perfusión de los oviductos a las 10 hs post-apareo. Los cumulus oophorus fueron incubados con hialuronidasa (Sigma, 0.1% en RFM)

con el objeto de remover las células foliculares.

Los espermatozoides recuperados como del oviducto fueron utilizados para la preparación de extendidos, los cuales fueron posteriormente fijados con el fin de ser sometidos a la técnica de IIF. En los casos en los cuales fue analizada la localización de DE en espermatozoides asociados al cumulus oophorus o presentes en el espacio perivitelino, los cumulus enteros o los ovocitos libres de células del cumulus fueron colocados en vidrios de reloj y fijados en p-formaldehído 2% en PBS durante 60 min a temperatura ambiente para ser posteriormente lavados por transferencia a través de varias gotas de PBS-BSA 4. Posteriormente fueron sometidos a los pasos de IIF ya descriptos, realizándose las incubaciones en vidrios de reloj, y utilizando tanto el primer como segundo anticuerpo en una dilución de 1:20.

II.18. Ensayos de fertilización y fusión in vitro

II.18.1. Obtención de ovocitos

i) Recuperación de los ovocitos luego de la ovulación.

Con el fin de recuperar los ovocitos presentes en la ampulla de las hembras superovuladas, luego de 12 - 15 hs post-hCG (momento alrededor del cual se produce la ovulación), las mismas fueron anestesiadas por inhalación de éter sulfúrico, procediéndose a la extracción de los oviductos enteros. En aquellos casos en los cuales se intentó realizar la recuperación en forma inmediata a la ocurrencia de la ovulación, las hembras fueron sacrificadas a

distintos intervalos a partir de las 8 hs post-hCG con el fin de verificar el momento en el cual se encontraban los ovocitos en la ampulla. En esta serie de ensayos la ovulación no se produjo antes de las 12 hs post-hCG en la mayoría de los casos, pudiéndose encontrar ovocitos en horarios previos (10 - 11 hs post-hCG) solamente en dos ocasiones.

Una vez obtenidos los oviductos, los mismos fueron dispuestos en una gota de RFM fresco para proceder a la punción de la ampulla, la cual fue realizada bajo una lupa estereoscópica (Nikon). Como consecuencia de la punción, el cumulus oophorus fue liberado y recuperado en una gota de medio mantenido a 37°C.

En aquellos casos en los cuales se utilizaron ovocitos libres de las células del cumulus (con o sin zona pellucida), las mismas fueron desprendidas por tratamiento con hialuronidasa. Con esta finalidad, se procedió a transferir los cumulus enteros a gotas conteniendo 0.1% de hialuronidasa en PBS-BSA 4, durante 5 min a 37°C. Una vez liberados los ovocitos, los mismos fueron transferidos a gotas de medio libre de enzima y lavados mediante 5 - 6 pasajes sucesivos a través de gotas de medio fresco.

ii) Obtención de ovocitos sin zona pellucida

Con el fin de realizar los ensayos de fusión *in vitro*, los ovocitos sin zona pellucida se obtuvieron siguiendo la técnica descrita por Nicolson et al. (1975). El procedimiento consistió en el tratamiento de los ovocitos libres de células del cúmulus con una solución de Tyrode ácida (pH 2.5) por espacio de 5 - 15 segundos. La composición de la solución de Tyrode ácida se encuentra descrita en la Tabla II.5.

Tabla II.5. Composición del medio Tyrode ácido

Componente	Concentración (gr/l)
NaCl	8.00
KCl	0.20
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0.26
MgCl ₂ . 6H ₂ O	0.046
Na ₂ HPO ₄ . H ₂ O	0.05
Glucosa	1.00
NaHCO ₃	1.00
Polivinilpirrolidona	4.00

El pH del medio fue ajustado a 2.5 mediante el agregado de HCl 5 N. La esterilización del mismo fue realizada por filtración en membranas Millipore 0.22 μ m, siendo el medio mantenido fraccionado a -20°C hasta el momento de ser utilizado.

A medida que se verificaba la solubilización de las zonas, los ovocitos eran retirados en forma inmediata, para ser posteriormente lavados por pasaje a través de varias gotas de medio RFM fresco.

iii) Obtención de ovocitos inmaduros.

Con el fin de proceder a la obtención de ovocitos inmaduros, las gonadotrofinas hCG y PMSG fueron administradas a hembras prepúberes y, entre las 4 y 2 horas antes de que se produjera la ovulación, las hembras fueron sacrificadas y sus ovarios extraídos para ser dispuestos en gotas de medio RFM contenidas en una cápsula de Petri. Se procedió entonces a realizar, bajo lupa, la punción de aquellos folículos que se encontraran más turgentes con el fin de permitir la liberación de los ovocitos allí contenidos. Para desprender las células de la granulosa, los mismos fueron transferidos a tubos de ensayo conteniendo 2 ml de citrato de sodio 2%, siendo incubados por espacio de 2 min a temperatura ambiente, con agitación continua y vigorosa. Una vez finalizado este período, los ovocitos fueron lavados mediante varios pasajes a través de gotas de medio fresco.

En todos los casos, 10 - 20 ovocitos fueron finalmente dispuestos en una gota de RFM (100 ul), situada en el hoyo central de cápsulas de Petri para cultivo de órgano (Falcon), cubiertas por aceite de parafina. El manipuleo de los mismos se realizó utilizando pipetas de vidrio estiradas por calentamiento, conectadas a una cánula de goma para ser operadas con la boca.

II.18.2. Ensayo de fertilización de ovocitos intactos

Para la realización de los ensayos de fertilización de ovocitos intactos, luego de 20 - 30 min de permanencia de los ovocitos en las cápsulas, los espermatozoides capacitados fueron agregados a las mismas en una concentración final de $2 - 5 \times 10^5$ esp/ml, continuando la incubación a 37°C y en una atmósfera de 5% CO₂, por espacio de 14 hs.

Una vez concluido el período de coincubación, los ovocitos fueron transferidos a una gota de RFM fresco, siendo liberados de los espermatozoides débilmente asociados a su superficie por sucesivos lavados con pipeta a través de gotas de medio. Finalmente, fueron dispuestos sobre portaobjetos, colocándose sobre los mismos un cubreobjetos conteniendo en cada esquina 1 gota compuesta por una mezcla de 9 partes de vaselina líquida y 1 de parafina. La colocación del cubreobjetos fué realizada mediante una presión suave, con el fin de evitar la lisis de los ovocitos, y a la vez permitir la rotación de los mismos durante su examinación bajo el microscopio de contraste de fase (Nikon, Optiphot), utilizándose para la evaluación de la penetración un aumento de 500 x.

En estos ensayos fueron considerados *fertilizados* aquellos ovocitos con zona pellucida que presentaban decondensación de la cabeza del espermatozoide o presencia de pronúcleos y cola del espermatozoide incorporada al ooplasma. Fueron considerados *penetrados* aquellos ovocitos que contenían espermatozoides que habían penetrado la zona pellucida y se localizaban en el espacio perivitelino.

II.18.3. Ensayo de fusión a ovocitos sin zona pellucida.

En el caso de los ensayos de fusión a ovocitos sin zona pellucida, los espermatozoides fueron agregados en concentraciones entre $2 - 5 \times 10^4$ y $2 - 5 \times 10^5$ esp/ml, de acuerdo al experimento realizado (ver Sección Resultados). Independientemente de la concentración de espermatozoides utilizada, la coincubación de las gametas se realizó por espacio de 2 hs bajo las condiciones descriptas para la fertilización de ovocitos intactos.

Nuevamente, la recuperación, lavado y examinación de los ovocitos sin zona pellucida fue realizada de acuerdo al procedimiento descrito para los ovocitos intactos. En estos ensayos, fueron considerados *penetrados* aquellos ovocitos sin zona pellucida que presentaban dispersión de la cabeza del espermatozoide o presencia de pronúcleos y cola del espermatozoide incorporada al citoplasma. Para evaluar la presencia de cabezas dispersas de los espermatozoides en el ooplasma se recurrió a la técnica de tinción con aceto-carmin (0.5% carmin en una solución de ácido acético 45%). Cabe mencionar que cada vez que en un ovocito no era posible visualizar la cabeza de un espermatozoide, pero sí el flagelo, la posterior tinción reveló la presencia de la cabeza dispersa en el ooplasma.

La Figura II.2a muestra un ejemplo de un ovocito sin zona

pellucida antes de ser sometido a la técnica de tinción, en el cual es posible visualizar los flagelos de los espermatozoides, pero no las cabezas correspondientes a los flagelos. La Figura II.2.b muestra el mismo ovocito luego de ser sometido a la tinción con aceto-carmin, en el cual es posible observar las cabezas dispersas de los espermatozoides. La Figura II.2.c muestra un ovocito con los dos pronúcleos femenino y masculino, y la cola del espermatozoide incorporada al citoplasma.

En los ensayos de penetración *in vitro* fueron evaluados los siguientes parámetros:

El *porcentaje de penetración*, siendo el mismo calculado como:

$$\frac{\text{n}^\circ \text{ de ovocitos penetrados}}{\text{n}^\circ \text{ de ovocitos totales observados}}$$

El *índice de penetración*, siendo este parámetro calculado como:

$$\frac{\text{n}^\circ \text{ de espermatozoides incorporados al ooplasma totales}}{\text{n}^\circ \text{ de ovocitos penetrados totales}}$$

II.18.4. Ensayos del efecto de anti-DE sobre la penetración de ovocitos sin zona pellucida *in vitro*.

En aquellos experimentos en los cuales se evaluó el efecto del anticuerpo anti-DE sobre la capacidad de penetración de los espermatozoides a ovocitos sin zona pellucida, los espermatozoides capacitados fueron agregados a gotas de 100 μ l de medio RFM previamente equilibrado y mantenido a 37°C bajo aceite, conteniendo distintas dosis de anti-DE (0.25, 0.5 y 1 mg/ml). Las

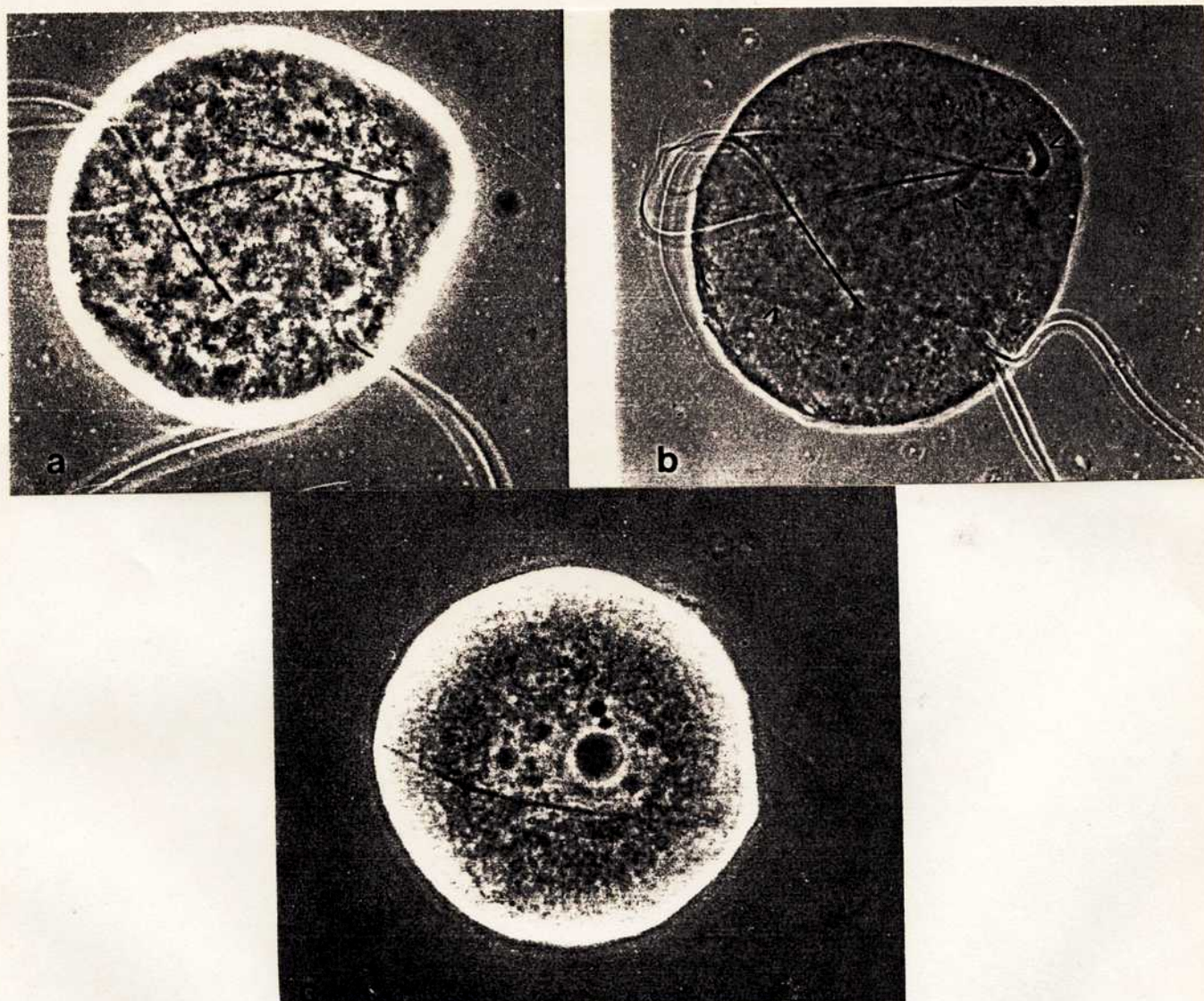


Figura II.2: Evaluación de la penetración a ovocitos sin zona pellucida.

(a) Fotografía de un ovocito sin zona pellucida penetrado por tres espermatozoides, antes de ser sometido a la técnica de tinción. No se visualizan las cabezas de los espermatozoides incorporados.

(b) Fotografía del mismo ovocito (a), luego de ser sometido a un proceso de tinción con aceto-carmin. Las flechas indican la localización de las cabezas dispersas.

(c) Fotografía de un ovocito sin zona pellucida penetrado, presentando dos pronúcleos (masculino y femenino) y la cola del espermatozoide incorporada al citoplasma.

concentraciones finales de espermatozoides utilizadas en el ensayo de fusión fueron de $2 - 5 \times 10^4$ esp/ml (penetración monospermica) o de $2 - 5 \times 10^5$ (penetración polispermica).

Luego de un período de incubación de 20 min bajo las condiciones descriptas, los ovocitos sin zona pellucida fueron agregados a las gotas conteniendo los espermatozoides, y la coincubación prosiguió por espacio de 2 hs bajo las condiciones descriptas en el punto II.18.3.

Con el fin de establecer si el agregado del anticuerpo afectaba de algún modo a los ovocitos en sí, los mismos fueron incubados con anti-DE 1 mg/ml durante 2 hs, para ser posteriormente lavados para eliminar al exceso de anticuerpo, y finalmente inseminados con espermatozoides previamente capacitados en ausencia de anti-DE.

II.18.5. Efecto del agregado de la proteína DE purificada en el ensayo de fusión in vitro.

En los experimentos en los cuales se evaluó el efecto de la preincubación de los ovocitos con proteína DE purificada sobre su posterior penetración, los mismos fueron dispuestos en gotas de 100 μ l de RFM previamente equilibrado y mantenido a 37°C bajo aceite, conteniendo las distintas concentraciones de proteína ensayadas. La incubación prosiguió por espacio de 30 min bajo las condiciones mencionadas, y, una vez completado este período, los ovocitos fueron inseminados con espermatozoides capacitados, en una concentración de $0.5 - 1 \times 10^5$ esp/ml. Luego de 2 hs de incubación se procedió a la recuperación y evaluación de la

penetración de los mismos siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

Tal como ha sido mencionado, la proteína DE utilizada en estos ensayos fue purificada siguiendo la técnica descrita por Garberi et al. (1983). Las proteínas ovoalbúmina, anhidrasa carbónica y α -lactalbúmina utilizadas como controles, fueron obtenidas de Sigma.

II.19. Ensayos de unión al oolema

Los ensayos de unión de los espermatozoides a la membrana plasmática de los ovocitos *in vitro* fueron realizados utilizando el mismo procedimiento descrito para los ensayos de fusión *in vitro* pero limitando el período de coincubación de las gametas a 30 min.

Una vez concluido este período, los ovocitos con espermatozoides unidos fueron transferidos a una gota de RFM fresco. El manipuleo de los mismos fue realizado utilizando una pipeta de un diámetro cercano a 1.5 veces el ovocito, (mayor que el utilizado en los ensayos de fusión) con la finalidad de evitar la remoción de los espermatozoides unidos al oolema durante la recuperación y lavado de los mismos. Se empleó una misma pipeta para el manipuleo de los ovocitos pertenecientes a todos los grupos de tratamiento de un mismo experimento, con la finalidad de eliminar esta variable en la comparación de resultados.

Una vez recuperados, los ovocitos fueron lavados por pasajes sucesivos a través de tres gotas de medio, para ser finalmente transferidos a una gota conteniendo 100 μ l de glutaraldehído 4%

en PBS, y fijados por 10 - 20 min a temperatura ambiente. Tras concluir este período, los ovocitos fueron montados de acuerdo a lo descrito en el punto II.18. siendo evaluados dos parámetros:

El porcentaje de ovocitos con espermatozoides unidos

El *índice de unión* calculado como:

$$\frac{\text{n}^\circ \text{ total de espermatozoides unidos}}{\text{n}^\circ \text{ total de ovocitos con esp. unidos al oolema}}$$

En aquellos casos en los cuales se evaluó la capacidad de penetración de los espermatozoides ya unidos al oolema, los ovocitos con espermatozoides unidos a su superficie fueron lavados por pasaje a través de gotas de medio equilibrado mantenido a 37°C y bajo aceite, (siendo utilizada en este procedimiento una pipeta de ancho diámetro), depositados en gotas de RFM contenidas en cápsulas de Petri bajo aceite, y finalmente incubados por espacio de 2 hs adicionales bajo las condiciones mencionadas.

II.19.1. Efecto de anti-DE sobre la unión de los espermatozoides al oolema

El efecto del agregado del anticuerpo anti-DE a espermatozoides capacitados sobre su capacidad de unión al oolema, se realizó siguiendo el procedimiento descrito en el punto II.18.4., siendo los ovocitos recuperados tras un período de 30 min de coincubación.

II.19.2. Efecto del agregado de la proteína DE sobre la unión de los espermatozoides al oolema.

En aquellos experimentos en los cuales se evaluó el efecto del agregado de DE purificada sobre la capacidad de unión de los espermatozoides a la superficie del ovocito, se utilizó el esquema descrito en el punto II.18.5., siendo recuperados los ovocitos a los 30 min de coincubación con los espermatozoides.

II.20. Inmunofluorescencia de ovocitos preincubados con la proteína DE.

La técnica de IIF se realizó sobre ovocitos preincubados durante 30 min a 37°C o 4 °C con proteína DE (0.2 mg/ml). Como control, se utilizaron ovocitos preincubados con ovoalbúmina (OA) y fibronectina (FN) (0.2 mg/ml). En todos los casos, luego del período de incubación mencionado, los ovocitos fueron posteriormente fijados en 1 ml de p-formaldehído 2% durante 60 min a temperatura ambiente.

La fibronectina (FN) fue gentilmente provista por el Dr. J. Tezón. El anticuerpo policlonal anti-FN fue adquirido de laboratorios Sigma.

Una vez concluida la fijación, la técnica utilizada consistió en los siguientes pasos:

1. Lavado por pasaje a través de tres gotas de PBS-BSA 4.
2. Bloqueo con SCAN 5% en PBS-BSA 4, 30 min a 37°C.

3. Incubación con 100 μ l de anti-DE, anti-FN o IgG de conejo no inmunizado 1:20 en SCAN 1% en PBS-BSA 4 durante 60 min a 4°C seguidos de 60 min a 37°C.
4. Tres lavados de 10 min cada uno en 250 μ l de PBST-BSA 10.
5. Incubación en 100 μ l de anti-IgG de conejo-FITC (1:25) en PBST-BSA 10, 30 min a 37°C.
6. Idem 4.
7. Lavado por pasaje a través de varias gotas de PBS 0.02% Tween 20 conteniendo 10 mg/ml BSA (PBST-10).
9. Transferencia a portaobjetos, y aplicación de cubreobjetos conteniendo la mezcla de parafina-vaselina en las esquinas y una gota de glicerol 90% en PBS en el centro.

En aquellos casos en los cuales fue examinada la localización de los cromosomas en los ovocitos, los mismos fueron transferidos por 5 segundos a una solución 1 mM de naranja de acridina en RFM conteniendo 3% de DMSO, para ser posteriormente lavados y montados utilizando el procedimiento descripto.

Todos los pasos de incubación mencionados fueron realizados en vidrios de reloj. Los ovocitos fueron examinados en microscopio de epifluorescencia con un aumento de 500 x.

II.21. Incubación de espermatozoides inmaduros bajo condiciones capacitantes in vitro.

En aquellos experimentos en los cuales espermatozoides provenientes de las regiones más proximales del epidídimo (caput y corpus) fueron incubados bajo condiciones capacitantes *in vitro* con el fin de evaluar los porcentajes de redistribución de DE en

los mismos y su capacidad de fusión, se procedió a separar con tijera las distintas regiones epididimarias teniendo en cuenta los límites indicados en la Fig. II.1. En los casos de los espermatozoides provenientes del caput y corpus proximal, no fue realizada una selección por natación debido a que, tal como ha sido mencionado en la Introducción, los espermatozoides inmaduros no presentan motilidad progresiva al ser liberados del plasma seminal. Por lo tanto se procedió a disponer las secciones de órgano obtenidas, en cápsulas de cultivo de tejido estériles (3 mm, Falcon) conteniendo 1 ml de RFM equilibrado con 5% CO₂, sobre una platina térmica (Fisher, Thermix) mantenida a 37°C. Se realizaron varios cortes en cada una de las regiones, de modo de facilitar la salida de los espermatozoides y, una vez producida la misma, las suspensiones fueron suavemente rotadas para lograr su homogeneización, descartándose los restos de tejido. En el caso de los espermatozoides provenientes del corpus distal, si bien fué realizada la selección por natación, la misma se realizó cubriendo a los espermatozoides depositados en el fondo de un tubo cónico con 500 ul de RFM, a diferencia de los 2 ml de medio corrientemente utilizados para la preparación de las suspensiones de los espermatozoides del cauda.

Una vez producida la homogeneización de las suspensiones, se procedió a determinar la concentración de espermatozoides en las mismas, con el fin de ser depositados en los hoyos de capacitación e incubados bajo las condiciones descriptas en la sección II.10.2.

La técnica de IIF, así como los ensayos de fusión y unión al oolema, fueron realizados siguiendo los procedimientos descriptos para la realización de estas técnicas con espermatozoides maduros.

II.21.1. Incubación de espermatozoides provenientes del corpus distal con la proteína DE.

En esta serie de experimentos, luego de preparar una suspensión de espermatozoides provenientes del corpus distal de acuerdo al procedimiento descrito, los espermatozoides fueron agregados a medio RFM equilibrado y mantenido a 37°C, conteniendo distintas concentraciones de proteína DE. Tras una incubación de 5 hs bajo condiciones capacitantes, estos espermatozoides fueron utilizados en los ensayos de fusión y unión al oolema descritos anteriormente.

III. Resultados
Primera Parte

III. RESULTADOS.

PRIMERA PARTE: ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE LA PROTEINA "DE" DURANTE EL PROCESO DE CAPACITACION DE LOS ESPERMATOZOIDES.

III.1. Características de la proteína DE presente en la superficie de los espermatozoides maduros.

III.1.1. Análisis por electroforesis e inmuno-electrotransferencia ("Western blot").

Tal como ha sido mencionado al inicio de este trabajo, la proteína DE se sintetiza en el epidídimo de rata en forma andrógeno-dependiente, asociándose a la región dorsal de los espermatozoides a medida que los mismos descienden por el epidídimo. Si bien la presencia de DE sobre los espermatozoides fue originalmente comprobada mediante las técnicas de fijación de complemento e inmunofluorescencia (Kohane et al.,. 1979, 1980ab), hasta el momento no había sido demostrado si la proteína asociada a la membrana de los espermatozoides presentaba alguna alteración con respecto a la presente en el epitelio y lumen epididimario. Como una aproximación al estudio de la identidad entre la proteína reconocida por el anticuerpo en el epidídimo y la reconocida sobre los espermatozoides, se propuso analizar si ambas poseían igual movilidad electroforética en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes, constituyendo éste un criterio de identidad entre las mismas. Con esta finalidad, se comparó el patrón de bandas correspondiente a las proteínas de citosol de epidídimo y a aquellas presentes en extractos de

membrana de espermatozoides del cauda epididimario (mediante el tratamiento con Tritón X-100) obtenidos al ser ambas muestras sometidas a un proceso de separación electroforética en geles nativos de poliacrilamida, posterior transferencia a nitrocelulosa y revelado con el anticuerpo anti-DE (inmuno-electrotransferencia o "Western blot").

Para llevar a cabo estos estudios, se utilizó un anticuerpo policlonal específico dirigido contra DE (anti-DE), producido y purificado de acuerdo a la técnica descrita por Garberi et al., (1979). Para corroborar la especificidad del anticuerpo anti-DE mediante la técnica de inmuno-electrotransferencia fueron también sometidas al procedimiento mencionado muestras correspondientes a citosol testicular, el cual no contiene a la proteína DE, y proteína DE purificada.

Con el fin de comprobar que el tratamiento de los espermatozoides con Tritón X-100 lograba la remoción de todas las proteínas reconocidas por anti-DE en la membrana de los espermatozoides, los mismos fueron sometidos a una IIF luego del su tratamiento con Tritón. De este modo, se evitaba la posibilidad de que otros antígenos reconocidos por anti-DE pudieran no ser extraídos con el tratamiento con tritón X-100.

Los resultados de esta IIF (Tabla III.1) revelaron la ausencia de toda marca fluorescente en los espermatozoides, indicando la completa extracción de la proteína reconocida por anti-DE mediante el tratamiento mencionado.

Cabe destacar que la proteína DE corre como dos bandas en geles de poliacrilamida no desnaturizantes, las cuales no son separables en base a su solubilidad, o peso molecular (Garberi et

Tabla III.1. Efecto de distintos tratamientos de extracción proteica sobre la presencia de la proteína DE en los espermatozoides.

Tratamiento	% espermatozoides marcados	localización de la marca
A. Ninguno	99	región dorsal del acrosoma
B. Tritón X-100 1%	0	
C. ClNa 0.6 M	100	región dorsal del acrosoma

Los espermatozoides fueron recuperados del cauda epididimario para ser posteriormente sometidos a una fijación directa con p-formaldehído 2% en PBS durante 10 min a temperatura ambiente (A.), o alternativamente incubados con Tritón X-100 1% en PBS-PMSF durante 60 min a temperatura ambiente (B.), o con SWM 0.6 M ClNa durante 45 min a 37°C (C.). Una vez concluidos los periodos de incubación descriptos para B. y C., los espermatozoides fueron sometidos a un proceso de fijación con p-formaldehído. En todos los casos, los espermatozoides fueron sometidos a la técnica de IIF descripta.

al., 1979), siendo las mismas consideradas en este estudio como una única entidad.

Los resultados se presentan en la Fig. III.1, en la cual se observa que mientras no se detectó ninguna banda en la muestra correspondiente al citosol de testículo, solamente se visualizan dos bandas en las muestras correspondientes a citosol epididimario y proteínas de membrana de los espermatozoides, con movilidad electroforética idéntica a las bandas correspondientes a la proteína DE purificada. Estos resultados por un lado, no sólo confirman la especificidad del anticuerpo para la proteína DE, sino que a su vez demuestran, la identidad entre la proteína presente en el citosol epididimario y aquella asociada a la membrana de los espermatozoides, en base a sus características electroforéticas.

De acuerdo a los estudios realizados por Kohane et al., (1980b) utilizando la técnica de fijación de complemento, el tratamiento de espermatozoides maduros no capacitados con un medio de alta fuerza iónica producía la pérdida de una gran cantidad de proteína DE de la superficie de los mismos. Sin embargo, aún luego de este tratamiento, cierta porción de la proteína reconocida por el anticuerpo anti-DE permanecía asociada a la superficie de los espermatozoides. De estos experimentos se concluyó que existirían dos poblaciones de proteína DE: una población "débilmente unida" que correspondería a aquella extraíble con una solución de ClNa 0.6 M, y una segunda población "fuertemente unida", la cual permanecería unida a la superficie de los espermatozoides aún luego del tratamiento salino. Se propuso investigar si las dos poblaciones de proteína DE poseían la misma movilidad al ser sometidas a una electroforesis en geles

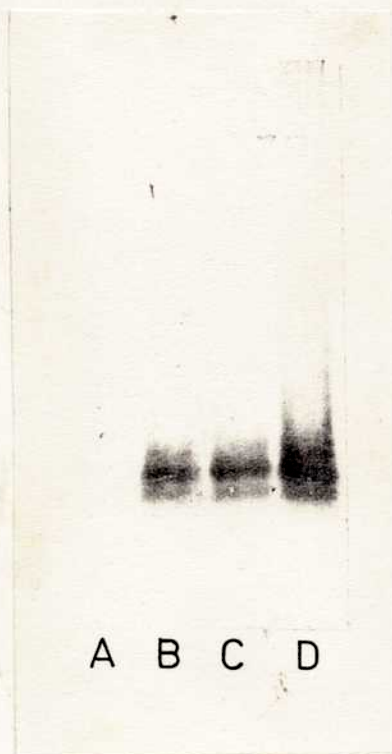


Fig. III.1. Movilidad electroforética de los componentes reconocidos por anti-DE en el citosol epididimario y en la membrana plasmática de los espermatozoides. Muestras correspondientes a citosol testicular (A), epididimario (B), a proteínas de membrana plasmática del espermatozoide extraídas con Tritón X-100 (C) y proteína DE pura (D) fueron sometidas a una separación en geles de poliacrilamida no desnaturizantes (7.5%) para ser posteriormente transferidas a nitrocelulosa y reveladas utilizando el anticuerpo anti-DE.

de poliacrilamida no desnaturalizantes y posterior inmunoelectrotransferencia.

Con esta finalidad se realizó una extracción secuencial de proteínas que consistió en un primer paso de tratamiento de los espermatozoides con fuerza iónica (ClNa 0.6 M), con el fin de remover la población débilmente unida, seguido de una incubación de los mismos con Tritón X-100 con el fin de extraer la proteína remanente fuertemente unida.

Los resultados, presentados en la Fig. III.2, indicaron que anti-DE reconoció las mismas bandas en las dos muestras, indicando que las poblaciones mencionadas de proteína DE no serían diferenciables, al menos por sus características electroforéticas.

III.1.2. Análisis por inmunofluorescencia

Tal como ha sido mencionado, la proteína DE se asocia a la región dorsal del acrosoma de los espermatozoides durante el proceso de maduración epididimaria. La Fig. III.3 a-b muestra la localización dorsal de DE en un espermatozoide procedente del cauda epididimario, fijado y sometido a la técnica de IIF utilizando anti-DE como primer anticuerpo. A su vez, la Fig. III.3 c-d muestra un espermatozoide epididimario incubado con IgG de conejo normal, el cual no presenta marcación fluorescente.

Cabe mencionar que, cuando la técnica de IIF fue realizada sin previa fijación de los espermatozoides y a una temperatura de 37°C, la marca no se encontraba homogéneamente distribuida. Por el contrario, aunque siempre restringidas a la región dorsal, se evidenciaban zonas con mayor concentración de fluorescencia



Fig. III.2: Movilidad electroforética de las dos poblaciones de proteína DE presente en la membrana plasmática de los espermatozoides. Las proteínas extraídas en forma secuencial con un primer tratamiento con ClNa 0.6 M (A) seguido de una extracción con Tritón X-100 1% en PBS (B), fueron sometidas a una separación en geles de poliacrilamida no desnaturizantes (7.5%) para ser posteriormente electrotransferidas a nitrocelulosa y reveladas utilizando el anticuerpo anti-DE.

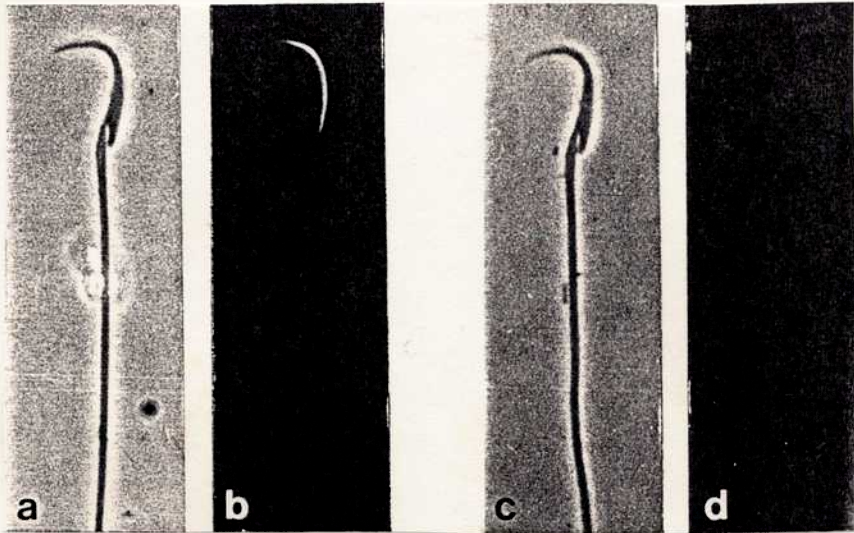


Fig. III.3: Localización de la proteína DE en espermatozoides recuperados del cauda epididimario. Los espermatozoides fueron recuperados del cauda epididimario, fijados y sometidos a la técnica de IIF descrita en Materiales y Métodos. Los pares de fotografías presentadas muestran al espermatozoide observado en contraste de fase (izquierda) y epifluorescencia (derecha). (a-b) Un espermatozoide tratado con anti-DE durante la técnica de IIF, presentando marca fluorescente en la región dorsal del acrosoma. (c-d) Un espermatozoide tratado con IgG de conejo normal, sin marca fluorescente (control).
Aumento: 625 x.

("patches"). Sin embargo, cuando la técnica de IIF se realizó a una temperatura de 4°C, la distribución de la marca resultó indistinguible de la presente en los espermatozoides fijados.

Dado que las dos poblaciones de DE presentes en la membrana del espermatozoide resultaban idénticas en cuanto a su movilidad en geles de poliacrilamida, resultaba interesante estudiar si, a su vez, poseían similar localización sobre los espermatozoides procedentes del cauda epididimario. Con esta finalidad, se procedió a utilizar la técnica de IIF sobre espermatozoides previamente tratados con ClNa 0.6 M, de modo de evaluar la localización y distribución de la proteína no removible por el tratamiento mencionado.

Los resultados se muestran en la Tabla III.1 e indicaron que, aún luego de la extracción con alta fuerza iónica, todos los espermatozoides presentaron a la proteína DE localizada uniforme y exclusivamente en la región dorsal del acrosoma. Por lo tanto, estos resultados permitieron concluir que las dos poblaciones poseían la misma localización sobre el espermatozoide. Si bien no fué posible determinar si la proteína eluible por tratamiento salino presentaba una distribución homogénea en la región mencionada, ya que la misma podía encontrarse sólo en ciertas áreas de la región dorsal, la proteína fuertemente unida se localizaba uniformemente distribuida en la región dorsal del acrosoma.

III.2. Estudio del destino de la proteína DE durante el proceso de capacitación in vitro.

Como se ha mencionado anteriormente, estudios previos

realizados por Kohane et al., (1980b) indicaron que, bajo condiciones capacitantes *in vivo* e incubaciones *in vitro*, se producía una pérdida substancial (alrededor de un 70%) de la proteína DE. Sin embargo, estos estudios no permitían determinar si lo observado era producto de:

a) una pérdida parcial de la proteína en todos los espermatozoides, de modo que cada célula permaneciera con una menor cantidad de proteína en la membrana, o

b) una pérdida total de DE en cierta sub-población de espermatozoides, resultando en una disminución del número de espermatozoides que presentarían a DE en su superficie.

Con el fin de discriminar entre estas dos posibilidades, resultaba necesario someter a los espermatozoides a un proceso de capacitación y analizar la presencia de DE en los mismos mediante la utilización de una técnica tal como la IIF, que permitiera visualizar a la proteína DE sobre los espermatozoides en forma individual. Teniendo en cuenta que en los trabajos originales no fué comprobado si las condiciones de incubación utilizadas permitían la ocurrencia de la capacitación de los espermatozoides, resultaba interesante re-examinar el destino de la proteína DE bajo condiciones necesariamente capacitantes y que por ende permitieran a los espermatozoides sufrir la reacción acrosomal y expresar su capacidad fertilizante.

III.2.1. Establecimiento de las condiciones adecuadas para la capacitación *in vitro*.

Tal como ha sido mencionado en la Introducción, como consecuencia del proceso de capacitación, los espermatozoides adquieren la capacidad de sufrir la reacción acrosomal. Por lo tanto, éste es un parámetro utilizado como indicador de la ocurrencia de la capacitación en los espermatozoides. Dado que a su vez la reacción acrosomal resulta imprescindible para que el espermatozoide fertilice al ovocito, la capacidad fertilizante de los espermatozoides es también ampliamente utilizada como parámetro de evaluación del proceso de capacitación.

En la rata, debido al pequeño tamaño del capuchón del acrosoma, no ha sido descrito hasta el momento una técnica que permita visualizar la ocurrencia de la reacción acrosomal por un sistema diferente de la microscopía electrónica. Por lo tanto, éste parámetro no puede ser utilizado como método corriente de evaluación de la capacitación, siendo necesario, en esta especie, recurrir a la medición de la capacidad fertilizante de los espermatozoides como índice de su grado de capacitación.

Sin embargo, la fertilización *in vitro* en la rata ha demostrado ser una técnica muy difícil de reproducir ya que, entre todos los laboratorios dedicados al estudio del proceso de fertilización, sólo tres grupos (Toyoda & Chang, 1974; Vanderhyden & Armstrong, 1989; Shalgi et al., 1981) han logrado desarrollarla con éxito. Debido a la gran variabilidad obtenida cuando la técnica es desarrollada completamente *in vitro* (capacitación y fertilización), uno de estos grupos (Shalgi et al., 1981) utiliza frecuentemente una capacitación parcial *in vivo* previo a la transferencia de los espermatozoides a condiciones *in vitro*. A su vez, el grupo de Armstrong, utiliza frecuentemente suero en la

capacitación de los espermatozoides, con el fin de evitar el deterioro de la motilidad de los mismos durante las incubaciones.

Si bien la respuesta a las dos alternativas posibles para la pérdida de DE podía ser encontrada luego de someter a los espermatozoides a un proceso de capacitación *in vivo*, la realización de una investigación más profunda sobre el comportamiento de la proteína DE durante el proceso de capacitación requería la realización de estudios bajo condiciones de capacitación *in vitro*. A su vez, teniendo en cuenta que resultaba imprescindible contar con una técnica de fertilización *in vitro*, no sólo como sistema de evaluación de la capacitación, sino para la realización de los estudios sobre la posible función biológica de DE propuestos en la Segunda Parte de este trabajo, se intentó desarrollar la técnica mencionada en nuestro laboratorio.

Con esta finalidad, se realizaron una serie de estudios preliminares tendientes a evaluar la motilidad y viabilidad de los espermatozoides luego de una incubación por espacio de 5 hs, bajo las condiciones de incubación descriptas por Kohane y col.(1980b). De acuerdo a dicha metodología, la dispersión de la suspensión original de los espermatozoides se realizaba en una cápsula de Petri, a partir de la cual se tomaban alícuotas para ser depositados en gotas conteniendo el medio donde procedería la capacitación. Sin embargo, bajo las condiciones descriptas en el mencionado trabajo, los espermatozoides manifestaban una gran disminución de su motilidad al finalizar la incubación. Los mismos resultados fueron obtenidos al someter a los espermatozoides a una incubación por espacio de 5 hs bajo las

condiciones descritas por Shalgi et al., (1981), siendo éste el grupo que actualmente produce la mayor cantidad de trabajos empleando la fertilización *in vitro* en la rata.

Debido a que en la rata existe una gran variabilidad entre animales, tanto en la viabilidad como en la motilidad de los espermatozoides recuperados del cauda epididimario, se consideró necesario establecer un sistema de preparación de la suspensión original que permitiera, por un lado, analizar la calidad de la muestra y por otro, seleccionar aquellos espermatozoides con mayor motilidad en una misma muestra antes de comenzar el proceso de capacitación. Para ello, se procedió a adaptar, para los espermatozoides de rata, la técnica de "natación hacia la superficie" (swim-up), corrientemente utilizada para la capacitación de espermatozoides humanos. En este caso, los espermatozoides fueron depositados en el fondo de un tubo cónico, para ser posteriormente cubiertos por medio de capacitación equilibrado y mantenido a 37°C, con el fin de permitir que los espermatozoides más móviles ascendieran a la superficie del tubo.

Para comprobar si este procedimiento permitía una efectiva selección de los espermatozoides más móviles, se procedió a evaluar el porcentaje de viabilidad y motilidad presentado por las muestras sometidas al procedimiento mencionado y luego incubadas 5 hs bajo condiciones *in vitro*.

Al ser analizados los porcentajes de motilidad de los espermatozoides preparados por la metodología del "swim-up", e incubados bajo las condiciones descritas por Kohane et al., (1980b), no fué posible encontrar una mejoría en la motilidad de los mismos (10% - 30% de espermatozoides móviles al finalizar la incubación). Por el contrario, entre los espermatozoides

incubados bajo las condiciones descritas por Shalgi et al., (1981) se manifestó un incremento del porcentaje de células móviles al ser preparada la suspensión original según la misma metodología. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla III.2, en la cual son incluidos también aquellos obtenidos con espermatozoides cuya suspensión original fue preparada en una cápsula de Petri. Tal como puede observarse en la tabla mencionada, los porcentajes de viabilidad y motilidad de los espermatozoides que habían sido seleccionados por natación hacia la superficie del tubo, resultaron mayores que los encontrados entre los espermatozoides preparados en cápsula. A su vez, entre los primeros, la motilidad y viabilidad fué mayor entre los espermatozoides presentes en la capa más superficial (primeros 100 μ l) del tubo.

Por lo tanto, se procedió a adoptar este sistema para la preparación y selección inicial de aquellas suspensiones a partir de las cuales se realizaría la capacitación *in vitro*. Solamente fueron utilizadas aquellas que, al cabo de 15 minutos, presentaran una concentración mayor a 2×10^6 esp/ml en la región más superficial del tubo. Si la concentración resultaba menor significaba que la motilidad de los espermatozoides no era adecuada y la suspensión era descartada.

Una vez establecido el sistema que permitía obtener espermatozoides con altos porcentajes de viabilidad al cabo de 5 hs de incubación, se procedió a analizar la capacidad fertilizante de los mismos utilizando la técnica descrita por Shalgi et al., (1981).

Al analizar los resultados, sólo se encontró un ovocito

Tabla III.2. Influencia de la preparación original de los espermatozoides sobre su viabilidad luego de una incubación bajo condiciones capacitantes in vitro.

Preparación de la suspensión original	porcentaje de motilidad	porcentaje de viabilidad
A. En tubo cónico:		
1os. 100 ul	73.0 ± 9.9*	69.7 ± 7.0*
2os. 100 ul	48.1 ± 12.5	47.8 ± 10.0
3os. 100 ul	54.8 ± 29.0	50.2 ± 21.0
B. En cápsula de Petri		
	45.0 ± 5.0	39.8 ± 8.7

A. La preparación de la suspensión de espermatozoides se realizó por la metodología de natación hacia la superficie de un tubo cónico (ver descripción en el texto), recuperándose los espermatozoides presentes en los 300 ul más superficiales del tubo en volúmenes sucesivos de 100 ul, para ser posteriormente incubados bajo las condiciones capacitantes descriptas por Shalgi et al., (1981).

B. La preparación de la suspensión original de espermatozoides fué realizada en una cápsula de Petri, siendo los espermatozoides incubados bajo las condiciones descriptas en A. En ambos casos, luego de 5 hs de incubación, fueron evaluados los porcentajes de motilidad y viabilidad de las muestras.

*p < 0.001 vs cápsula y fracciones restantes, según test de χ^2

fertilizado entre 118 evaluados totales en cinco experimentos realizados, lo cual indicaba que si bien los espermatozoides se mantenían con una buena motilidad durante la incubación, las condiciones experimentales empleadas no resultaban adecuadas para la ocurrencia de la capacitación y/o fertilización *in vitro*.

Teniendo en cuenta la posible existencia de problemas en la metodología utilizada, se ensayaron diversas condiciones y diseños experimentales, entre los cuales se incluyeron variaciones en:

a) El medio de incubación: Se ensayó la capacidad fertilizante de los espermatozoides incubados en los tres medios descritos en la literatura hasta el momento como promotores de la capacitación en la rata: Toyoda & Chang (TCh, el cual fué utilizado para las incubaciones *in vitro* en el trabajo mencionado de Kohane et al., 1980b); Toyoda & Chang con alta concentración de calcio (TCh/+Ca²⁺) y Medio de Fertilización de Rata (RFM).

b) Los componentes del medio de incubación: Se evaluaron los efectos obtenidos utilizando distintos tipos de agua: tridestilada, desionizada (resistencia: 18 Megohm.cm) y esta última filtrada a través de dispositivos Millipore. También se ensayaron distintos tipos de albúmina sérica bovina: fracción V - Sigma, libre de ácidos grasos - Pentex, y distintos lotes de cada una de las albúminas mencionadas, siendo tanto la albúmina como el agua componentes críticos para el mantenimiento de la viabilidad de los espermatozoides.

c) El tipo de aceite de parafina: Se utilizó tanto aceite

pesado (viscosidad Saybolt 340/360, Sigma) como aceite liviano (viscosidad Saybolt 125/135, Fisher), siendo ambos tipos utilizados en las técnicas de fertilización *in vitro* en distintas especies.

d) El origen de los espermatozoides: Tal como ha sido mencionado en la Introducción, durante el proceso de eyaculación, los espermatozoides son cubiertos por secreciones provenientes de las glándulas accesorias, las cuales no solamente poseerían funciones decapacitantes, sino que acondicionarían a los mismos para el transporte en la hembra. Si bien los espermatozoides epididimarios son corrientemente utilizados para la fertilización *in vitro* en diversas especies, se investigó si, en el caso particular de la rata, los espermatozoides eyaculados poseían algún tipo de ventaja en la fertilización con respecto a los epididimarios. Esta hipótesis surgió en base a trabajos realizados en el hamster chino, en los cuales se demostró que los índices de penetración obtenidos con espermatozoides recuperados del conducto deferente resultaron mayores que los obtenidos con espermatozoides epididimarios (Yanagimachi et al., 1985)

e) El tipo de ovocitos: Teniendo en cuenta que los ovocitos de rata sufren fácilmente fenómenos de deterioro luego de producida la ovulación (Austin, 1970; Zernicka-Goetz, 1991), se evaluaron los porcentajes de fertilización obtenidos al ser utilizados ovocitos en presencia o no de cumulus oophorus, ovocitos maduros recuperados de la ampulla a distintos horarios luego de inyectada la hCG, e inmaduros recuperados del ovario.

En la Tabla III.3 se resumen, en forma esquemática, las

Tabla III.3. Efecto de distintas condiciones experimentales sobre la fertilización in vitro de rata.

Medio	H ₂ O	BSA Aceite		ovocitos			esp	motil esp	n° ovo	% fert (rango)
		hs	p-hCG	recuper	cum					
TCh	filt	FV	liv	12-13	amp	+	epi	+	81	0.6 (0 - 1)
TCh +Ca ²⁺	filt	FV	liv	12-13	amp	+	epi	+	295	1.0 (0 - 3)
							epi	++	277	1.7 (0 - 5)
	col	FV	liv	12-13	amp	+	eya	+	118	0.8 (0 - 2)
							epi	++	15	0
	trid	FV	liv	12-13	amp	+	epi	++	15	3.2 (0 - 7)
			pes	12-13	amp	+	epi	+++	40	0
							epi	++	169	0
		LA	liv	12-13	amp	+	eya	+	89	0 ---
RFM							epi	++	190	4.2 (0 - 25)
			liv	10-11	amp		epi	++	36*	28.0 (0 - 60)
	filt				ovar	-	epi	++	23	5.5 (0 - 11)
							epi	+++	434	0.9 (0 - 3)
		FV	liv	12-13	amp	+	eya	+	58	0 ---
							epi	+++	41	10.1 (6 - 14)

(ver hoja siguiente con aclaraciones)

Medios TCh: Toyoda & Chang,
TCh/+ Ca²⁺: Toyoda & Chang conteniendo 3.4 mM Cl₂Ca
RFM: Medio de Fertilización de Rata

Aqua Trid: tridestilada
Col: desionizada
Filt: desionizada y filtrada en Millipore

BSA FV: fracción V, Sigma
LA: libre de ácidos grasos, Pentex

Aceite Liv: aceite liviano (viscosidad Saybolt 125/135, Fisher)
Pes: aceite pesado (viscosidad Saybolt 340/360, Sigma).

Ovocitos
h p-HCG: tiempo de recuperación luego de la
administración de hCG
recuper: sitio de recuperación de los ovocitos,
ampulla (amp) o ovario (ovar)
cum: ovocitos rodeados (+) o libres (-) de cumulus
oophorus

Espermatozoides epi: epididimarios
eya: eyaculados

Motilidad % espermatozoides con motilidad vigorosa al
finalizar la incubación:
+: 10 - 30
++: 30 - 50
+++: 50 - 70

n° ovo: número de ovocitos examinados
% fert: porcentaje de ovocitos fertilizados
rango: mínimo y máximo porcentaje de fertilización obtenido

* sólo en 2 de 20 hembras se encontraron ovocitos en la ampulla
entre las 10 y 11 hs post-hCG, siendo 36 el número total de
ovocitos recuperados

distintas condiciones y diseños ensayados, con los respectivos porcentajes de fertilización obtenidos. Cabe mencionar que no se encuentra representado el orden secuencial en el que fueron realizados los experimentos.

Analizando los resultados allí descritos fue posible establecer las siguientes conclusiones:

- entre los medios ensayados, la motilidad de los espermatozoides fue considerablemente mayor al ser los mismos incubados en RFM, por lo tanto fué éste el medio utilizado para la evaluación de las restantes condiciones experimentales.
- entre los tipos de agua analizados, los mejores resultados fueron obtenidos al emplear agua desionizada y posteriormente filtrada
- el tipo de albúmina utilizada no demostró poseer influencia sobre los porcentajes de fertilización obtenidos
- la incubación bajo aceite mineral no permitió obtener mejores resultados que el empleo de aceite liviano
- la mayor frecuencia de resultados positivos se obtuvo utilizando ovocitos libres de células del cumulus.
- los espermatozoides epididimarios presentaron ventajas en la fertilización ya que su motilidad y capacidad de penetración fueron mayores con respecto a los eyaculados.

Si bien algunas condiciones permitieron obtener mayores porcentajes de penetración que otras, en general, el porcentaje de ovocitos fertilizados resultó ser extremadamente bajo y los resultados irregulares. No sólo fueron obtenidos resultados negativos con la fertilización sino que tampoco fue posible

encontrar entre los ovocitos no penetrados, espermatozoides asociados a la zona pellucida. Cabe mencionar que, tal como se muestra en la Tabla III.3, en un experimento en el cual fue posible recuperar los ovocitos de la ampulla en forma temprana, (10 hs post-hCG), se obtuvo un 60% de fertilización. Este alto porcentaje de fertilización obtenido al ser recuperados los ovocitos en forma temprana y, por ende, inmediatamente después de producida la ovulación, sugirió la posibilidad de que la recuperación inmediata de los mismos pudiera favorecer su posterior penetración al evitar alteraciones por envejecimiento. Sin embargo, estas condiciones no pudieron ser nuevamente reproducidas ya que, de tres nuevos ensayos en los cuales se abrieron hembras superovuladas (6 hembras/ensayo) en forma temprana (previo a las 12 hs post-hCG), sólo en una de ellas fue posible recuperar ovocitos de la ampulla (11 hs posteriores a la administración de gonadotrofina coriónica). Al ser utilizados los mismos en el ensayo de fertilización, los resultados fueron totalmente negativos (0% de fertilización, Tabla III.3). Tal como se muestra en la misma tabla, tampoco fue posible obtener resultados positivos con ovocitos recuperados de los ovarios de las hembras que aún no habían ovulado en el mencionado horario.

Estos resultados negativos podían tener dos orígenes:

- i) La no ocurrencia de cambios fisiológicos en los espermatozoides tales como la capacitación, reacción acrosomal y/o motilidad adecuada,
- ii) La ocurrencia de alteraciones en los ovocitos.

Si bien en base a los resultados obtenidos no fué posible

discriminar entre estas dos posibilidades, en un ensayo en el cual se obtuvo 0% de fertilización con espermatozoides epididimarios incubados en RFM, fueron encontrados dos ovocitos sin zona pellucida penetrados. Al ser realizados nuevos experimentos utilizando ovocitos liberados de su zona pellucida por tratamiento con medio ácido, se obtuvo nuevamente penetración de los mismos encontrándose los mayores porcentajes de penetración al utilizar las condiciones que habían resultado más favorables en los ensayos de fertilización de ovocitos intactos (Tabla III.3). Teniendo en cuenta que solamente aquellos espermatozoides que han sufrido la reacción acrosomal son capaces de fusionarse con el oolema, estos resultados indicaban la ocurrencia de la reacción acrosomal y por ende de la capacitación bajo las condiciones experimentales mencionadas.

Por lo tanto, los distintos ensayos realizados, no solamente permitieron establecer las condiciones experimentales para la ocurrencia de la capacitación *in vitro*, sino que también permitieron lograr el desarrollo del ensayo de penetración a ovocitos *in vitro*, el cual resultó fundamental para la realización de los estudios correspondientes a la Segunda Parte de este trabajo.

Actualmente se continúan realizando estudios tendientes a investigar la posible causa de la falta de penetración de los ovocitos intactos.

III.2.2. Cinética del proceso de capacitación *in vitro*.

Dado que, bajo las condiciones experimentales mencionadas, los espermatozoides eran capaces de sufrir los procesos de capacitación y reacción acrosomal, el próximo paso consistió en estudiar la cinética del proceso de capacitación *in vitro*. Con esta finalidad, los espermatozoides fueron incubados *in vitro* por espacio de 6 hs, recuperándose muestras a distintos tiempos luego de comenzada la incubación. Tras su recuperación, dichos espermatozoides fueron puestos en contacto con ovocitos sin zona pellucida durante un período de 2 horas (necesario para la ocurrencia de su penetración), siendo posteriormente recuperados y evaluado el porcentaje de penetración obtenido en función del tiempo de incubación.

Los resultados obtenidos se presentan en la Fig. III.4, e indicaron que los espermatozoides de rata requirieron un tiempo mínimo de incubación de 3 hs para expresar su capacidad de penetración a ovocitos sin zona pellucida. A partir de este horario, se produjo un aumento gradual en el porcentaje de ovocitos penetrados en función del tiempo de capacitación, alcanzando el 100% de penetración luego de un período de incubación de 5 horas. Este fue, por lo tanto, el tiempo requerido para que en la mayoría de los espermatozoides se complete el proceso de capacitación.

III.2.3. Análisis por el ensayo de ELISA de la proteína DE presente en espermatozoides capacitados.

Como se ha mencionado anteriormente, estudios previos habían demostrado la pérdida de una importante proporción de la proteína

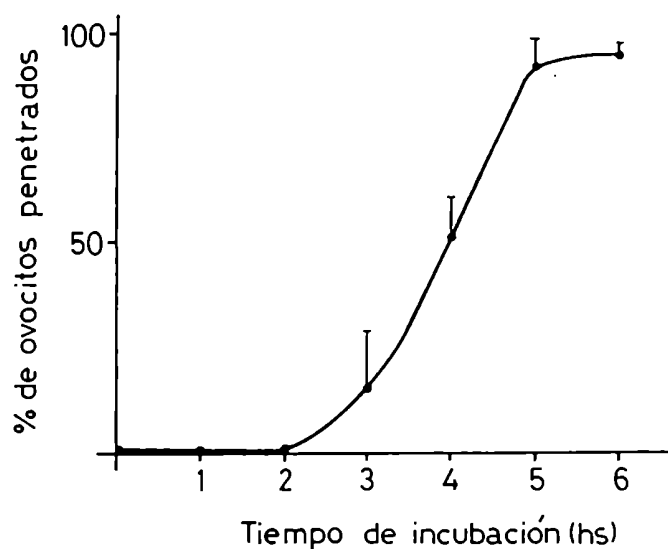


Fig. III.4. Cinética del proceso de capacitación in vitro. Los espermatozoides fueron incubados *in vitro* por espacio de 6 hs, recuperándose muestras a distintos tiempos luego de comenzada la incubación. Tras su recuperación, dichos espermatozoides fueron puestos en contacto con ovocitos sin zona pellucida durante un período de 2 horas. Al finalizar este período, los ovocitos fueron recuperados, evaluándose el porcentaje de penetración obtenido en función del tiempo de incubación.

DE durante incubaciones bajo condiciones *in vivo* e *in vitro* (Kohane et al., 1980b). Por lo tanto, se propuso investigar si bajo condiciones verdaderamente capacitantes, se producía la pérdida descrita de proteína DE.

Con esta finalidad, espermatozoides recuperados del cauda epididimario fueron capacitados *in vitro* por espacio de 5 hs, para ser posteriormente fijados y acoplados a placas de ELISA, procediéndose al análisis de la proteína DE presente en la superficie de los mismos.

Los resultados se muestran en la Fig. III.5 e indicaron que, como consecuencia de la incubación bajo condiciones capacitantes *in vitro*, se produjo una pérdida equivalente al 63% de la proteína con respecto a los espermatozoides no capacitados.

Existía la posibilidad de que la disminución observada fuera producto de un acople diferencial a la placa de ELISA entre los espermatozoides no capacitados, o de una pérdida diferencial de los espermatozoides durante los lavados. Para descartar estas posibilidades se procedió a recuperar y contabilizar a aquellos espermatozoides que luego del paso de acople no hubieran quedado adsorbidos a la placa, así como también a aquellos que se hubieran despegado durante las etapas de lavado del ensayo.

Los resultados obtenidos indicaron que el número de espermatozoides recuperados luego de la etapa de acople fue similar en ambos casos, así como también el número de espermatozoides recuperados en el volumen total de lavado al finalizar el ensayo.

En conjunto, estos resultados descartaron la posibilidad de que la pérdida detectada fuera producto de una interacción diferencial de los espermatozoides a las placas del ensayo.

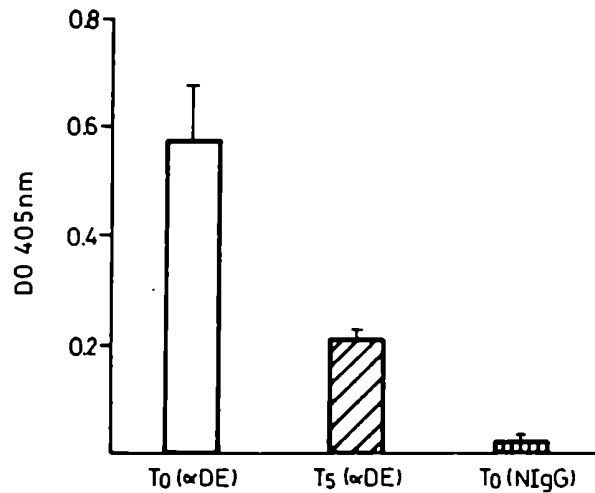


Fig. III.5. Ensayo de ELISA sobre espermatozoides recuperados luego de un proceso de capacitación *in vitro*. Espermatozoides directamente recuperados del cauda epididimario previo a su capacitación (T0) y espermatozoides capacitados *in vitro* por espacio de 5 hs (T5) fueron fijados y acoplados a placas de ELISA con el fin de proceder a la cuantificación de la proteína DE presente en la superficie de los mismos, siendo utilizado como primer anticuerpo anti-DE (T0, α-DE; T5, α-DE) o IgG de conejo normal como control (T0, NIgG). Se grafica la absorbancia medida (D.O. a 405 nm) para cada una de las muestras mencionadas. Los valores representan las medias ± E.S. de 3 experimentos independientes.

III.2.4. Presencia y localización de la proteína DE en los espermatozoides capacitados *in vitro*.

Una vez corroborada la existencia de la pérdida de DE luego de un proceso de capacitación *in vitro* bajo las condiciones experimentales descritas, se propuso estudiar si, tal como fuera mencionado anteriormente, dicha pérdida era producto de una remoción total de DE en un número determinado de espermatozoides o de una pérdida parcial de la proteína en la población de espermatozoides.

Para discriminar entre estas posibilidades, los espermatozoides fueron capacitados *in vitro* durante 5 hs, luego de lo cual fueron fijados, analizándose la presencia de DE en los mismos mediante la técnica de IIF.

Tal como se muestra en la Tabla III.4, los resultados indicaron que luego de 5 hs de capacitación *in vitro*, no pudo observarse una disminución en el número de células marcadas entre los espermatozoides capacitados (98%) con respecto a los no capacitados (99%), sugiriendo que la pérdida encontrada de DE sería consecuencia de la liberación parcial de la proteína presente en la membrana de los espermatozoides y no de la pérdida total de la misma en una proporción de estas células.

Sin embargo, analizando en forma detallada la localización de la proteína en los espermatozoides capacitados, se encontró que,

Tabla III.4. Presencia y localización de la proteína DE en espermatozoides recuperados luego de un proceso de capacitación *in vitro*.

Condiciones de incubación	n° exp	% de esp. marcados	% de esp. c/marca		% de motilidad
			D	SE	
Medio RFM, 0 h	12	99	96	4	70 - 80
Medio RFM, 5 h	13	98	47	51	60 - 70
PBS, 24 h	3	100	95	5	0

(D) región dorsal de la cabeza del espermatozoide, (SE) segmento ecuatorial del acrosoma del espermatozoide.

Espermatozoides no capacitados (Medio RFM, 0 h), espermatozoides sometidos a un proceso de capacitación *in vitro* durante 5 hs (Medio RFM, 5 h) y espermatozoides mantenidos en PBS por 24 hs a temperatura ambiente (PBS, 24 h), fueron fijados y la presencia de DE en los mismos analizada mediante la técnica de IIF.

tal como se describe en la tabla mencionada, un 51% de los mismos mostraba a la proteína DE con una localización diferente a la encontrada entre los espermatozoides no capacitados. A diferencia de la distribución original de DE restringida exclusivamente a la región dorsal, la nueva localización incluía a la mayor parte de la cabeza del espermatozoide. La Fig. III.6a muestra nuevamente la localización original de la proteína DE en la región dorsal de la cabeza del espermatozoide. La Fig. III.6b muestra a un espermatozoide presentando la nueva localización de la marca fluorescente. Teniendo en cuenta la descripción de los dominios que componen la cabeza del espermatozoide de rata (Fig. III.6c, Yanagimachi, 1988), se encontró que la nueva distribución de la proteína DE se correspondía con la región del segmento ecuatorial. Tal como se observa en el esquema mencionado, el dominio del segmento ecuatorial comprende la mayor parte de la cabeza del espermatozoide de rata.

Dado que, a pesar de ser utilizado el sistema de selección de la suspensión original previamente descrito, los espermatozoides capacitados presentaban una disminución de motilidad al cabo de 5 hs de incubación (Tabla III.4), se consideró la posibilidad de que esta nueva localización fuera una consecuencia de la pérdida de motilidad o deterioro que pudiera ocurrir durante la capacitación *in vitro*. Para descartar esta posibilidad, se utilizaron dos aproximaciones experimentales:

- a) se estudió la localización de DE en espermatozoides mantenidos en PBS por espacio de 24 hs a temperatura ambiente, siendo ésta una condición que provoca la muerte de la mayoría de los espermatozoides (determinado por la tinción vital de eosina),
- b) se realizó la técnica de IIF *in vivo*, sobre espermatozoides

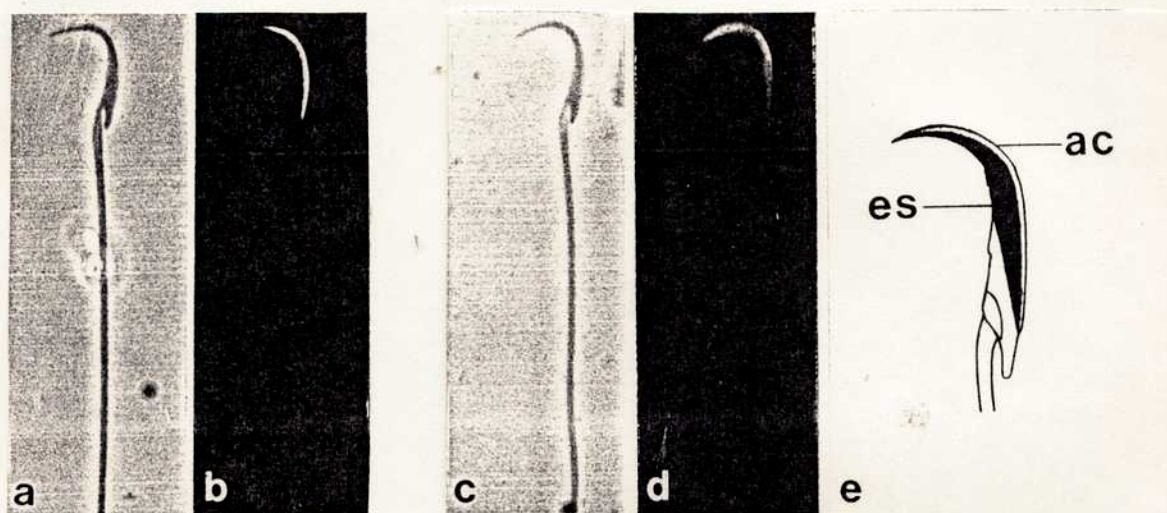


Fig. III.6. Localización de la proteína DE en espermatozoides capacitados *in vitro*. Los espermatozoides fueron capacitados *in vitro* por un período de 5 hs, luego de lo cual fueron fijados y sometidos a la técnica de IIF. Los pares de fotografías presentadas muestran al espermatozoide observado en contraste de fase (izquierda) y epifluorescencia (derecha).

(a-b) Un espermatozoide no capacitado, tratado con anti-DE en la IIF, presentando marca fluorescente en la región dorsal del acrosoma.

(c-d) Un espermatozoide recuperado luego de la capacitación y tratado con anti-DE en la IIF, presentando marca fluorescente en la región correspondiente al segmento ecuatorial del acrosoma.

Aumento: 625 x.

(e) Diagrama indicando los distintos dominios de la cabeza del espermatozoide de rata. (ac) capuchón acrosomal, (es) segmento ecuatorial, en negro. Extraído de Yanagimachi, (1981).

capacitados, para lograr observar la nueva localización de la proteína en espermatozoides vivos y móviles.

Los resultados indicaron que entre los espermatozoides mantenidos en PBS por 24 horas a temperatura ambiente, los cuales se encontraban completamente inmóviles y sólo mostraban un 30% de viabilidad, fué encontrado solamente un 5% de células con la nueva localización de DE (Tabla III.4).

Por otro lado, al ser realizada la técnica de IIF *in vivo* luego de la capacitación de los espermatozoides, se pudo detectar la nueva localización de DE en espermatozoides capacitados móviles, lo cual indicaba que la marcación en el segmento ecuatorial se manifestaba en espermatozoides vivos durante el proceso de capacitación de los mismos.

En conjunto, estos resultados descartaron la posibilidad de que la aparición de la proteína DE en el segmento ecuatorial fuera simplemente consecuencia de un fenómeno de deterioro o muerte de los espermatozoides.

III.2.5. Aparición de espermatozoides con DE en el segmento ecuatorial en función del tiempo de capacitación.

En base a los resultados descriptos en el punto anterior, existía la posibilidad de que la aparición de la proteína DE en el segmento ecuatorial, se relacionara con un cambio funcional de los espermatozoides tal como la capacitación y/o reacción acrosomal.

Con el fin de estudiar dicha posibilidad, espermatozoides

recuperados del cauda epididimario fueron incubados bajo condiciones capacitantes *in vitro* por un período de 6 hs. A distintos tiempos luego de comenzada la incubación, fueron recuperadas muestras de espermatozoides para ser fijadas y sometidas a IIF, analizándose posteriormente el porcentaje de espermatozoides con la proteína DE localizada en el segmento ecuatorial. Los resultados presentados en la Fig. III.7 indicaron que, durante la capacitación *in vitro*, se produjo un aumento gradual en el porcentaje de espermatozoides con la nueva localización de DE en función del tiempo de incubación, llegando a un máximo de 55% al cabo de 5 hs. Este valor no se modificó durante la hora siguiente de incubación.

Cuando estos resultados fueron comparados con los obtenidos para la cinética de fusión de los espermatozoides con el oolema (Fig. III.4) se observó la existencia de un paralelismo entre la ocurrencia de la nueva localización de DE y la capacidad de fusión de los espermatozoides con el ovocito en función del tiempo de capacitación. Teniendo en cuenta nuevamente la necesidad de la reacción acrosomal para la fusión de los espermatozoides con el oolema, la similar cinética de ambos fenómenos resultaba una nueva evidencia a favor de la asociación entre la presencia de DE en el segmento ecuatorial y un cambio funcional de los espermatozoides.

III.2.6. Influencia de la temperatura sobre la aparición de DE en el segmento ecuatorial.

Tal como ha sido previamente descripto (Yanagimachi, 1988a), la

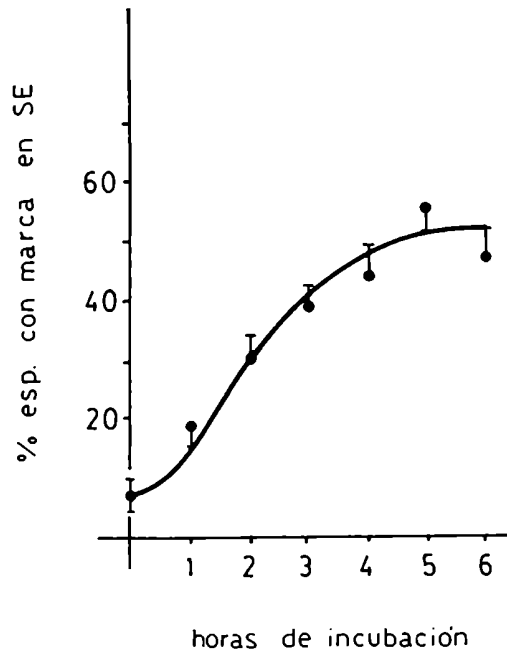


Fig. III.7. Cinética de aparición de espermatozoides con la proteína DE localizada en el segmento ecuatorial. Los espermatozoides fueron incubados bajo condiciones capacitantes *in vitro* por un período de 6 hs, recuperándose muestras a distintos tiempos para ser fijadas y sometidas a la técnica de IIF, evaluándose finalmente el porcentaje de espermatozoides con la proteína DE localizada en el segmento ecuatorial.

capacitación es un fenómeno dependiente de la temperatura. Temperaturas menores a 37°C no permiten la ocurrencia de este proceso bajo condiciones *in vitro*. Si la nueva localización de la proteína estuviera asociada con la ocurrencia de la capacitación y/o reacción acrosomal, la incubación a bajas temperaturas debería poseer un efecto inhibitorio sobre éste fenómeno.

Con el fin de investigar esta posibilidad, espermatozoides recuperados del cauda epididimario fueron incubados durante 5 hs en medio RFM mantenido a 4°C en una atmósfera de 5% CO₂ en aire, para ser finalmente fijados y analizados por IIF.

Los resultados se presentan en la Tabla III.5 y demostraron que bajo las condiciones mencionadas, se produjo una inhibición significativa en el porcentaje de espermatozoides con DE localizada en el segmento ecuatorial.

Cabe mencionar que, como consecuencia de la incubación a baja temperatura, se produjo una inhibición total de la motilidad de los espermatozoides. Con el fin de analizar si la menor redistribución era consecuencia de la inhibición de la motilidad de los espermatozoides, se evaluó el efecto de un inhibidor metabólico como lo es la azida de sodio sobre la redistribución de DE. Para ello, los espermatozoides fueron incubados durante 5 hs bajo condiciones capacitantes en presencia de este agente (0.2%), para ser posteriormente fijados y sometidos a un proceso de IIF. Los resultados (Tabla III.5.) indicaron que, a pesar de la inmotilidad provocada por la presencia de azida durante la incubación, los espermatozoides no manifestaron una inhibición del porcentaje de células con redistribución, lo cual indicaba que la disminución obtenida durante las incubaciones a 4°C era específicamente debida al efecto de la incubación a baja temperatura. Cabe mencionar que la azida por sí sola no provocó

Tabla III.5. Influencia de la temperatura sobre el porcentaje de espermatozoides con DE en el segmento ecuatorial.

Condiciones de incubación	n° exp	% de espermatozoides con marca en el SE	% de motilidad
RFM 5 h, 37°C	6	45.3 ± 7.0	60 - 70
RFM 5 h, 4°C	6	17.4 ± 7.2 *	0
RFM + azida 5 h, 37°C	3	46.6 ± 6.8	0

(SE) segmento ecuatorial
 Espermatozoides recuperados del cauda epididimario fueron incubados en medio RFM a una temperatura de 37°C (RFM 5 h, 37°C), o de 4°C (RFM 5 h, 4°C), o en presencia de azida de sodio 0.2 % * (RFM + azida, 5 h, 37°C), durante 5 hs en una atmósfera de 5% CO₂ en aire, para ser finalmente fijados y sometidos a la técnica de IIF, analizándose el porcentaje de espermatozoides con DE localizada en el segmento ecuatorial. Fué evaluada también la motilidad de las distintas muestras.

* p < 0.001 según test de X².

un aumento de la redistribución entre los espermatozoides no capacitados.

III.3. Posibles causas de la aparición de DE en el segmento ecuatorial.

La nueva localización de DE en el segmento ecuatorial de los espermatozoides durante la capacitación podía deberse a las siguientes causas:

- a) a una migración de moléculas originalmente presentes en la región dorsal del acrosoma.
- b) a una exposición de moléculas presentes en forma críptica en la región del segmento ecuatorial en los espermatozoides.
- c) a una combinación de ambos fenómenos.

Teniendo en cuenta estas tres posibilidades se intentó establecer la causa de la aparición de la proteína DE en una nueva región de la cabeza del espermatozoide.

III.3.1. Migración de DE al segmento ecuatorial

Con el fin de investigar la posible migración de DE al segmento ecuatorial, el esquema experimental utilizado consistió en los siguientes pasos:

- i) incubación de los espermatozoides con el anticuerpo

anti-DE durante los primeros 20 minutos de capacitación, permitiendo así la interacción del anticuerpo con las moléculas de DE originalmente expuestas,

- ii) lavado del anticuerpo en exceso y continuación del proceso de capacitación *in vitro* por 5 hs,
- iii) fijación e IIF, siendo utilizado sólo el segundo anticuerpo fluoresceinado.

Según este esquema experimental, los espermatozoides fijados eran directamente incubados con el segundo anticuerpo fluoresceinado. Por lo tanto, únicamente podían ser visualizadas por IIF, aquellas moléculas que se hubieran encontrado expuestas en la superficie del espermatozoide al inicio de la incubación y, por ende, se encontrarán disponibles para interactuar con anti-DE. Por el contrario, aquellas moléculas de DE que se hubieran expuesto después de haber sido removido el exceso de anticuerpo durante la capacitación, no serían reveladas. Si la aparición de la nueva localización de DE era producto de una migración de moléculas originalmente expuestas, el porcentaje de espermatozoides con DE localizada en el segmento ecuatorial debía resultar similar al obtenido bajo condiciones normales de capacitación (ver Tabla III.4). Si, por el contrario, era producto de moléculas expuestas durante la capacitación, las mismas no serían reveladas y el porcentaje de espermatozoides con redistribución resultaría inhibido.

Existía la posibilidad de que, aún después del lavado del punto ii, pudiera quedar cierta cantidad de anticuerpo disponible para asociarse a los espermatozoides durante la capacitación. Por lo tanto se estudió cuál era la dilución del anticuerpo anti-DE a

utilizar en el punto i), de modo que marcara efectivamente a los espermatozoides en suspensión pero que luego de un lavado fuera removido del medio de incubación. El último punto fue comprobado utilizando el sobrenadante obtenido como primer anticuerpo en una IIF.

La dilución adecuada resultó ser de 1:10, debido a que al ser agregado el anticuerpo en una mayor concentración (1:5), el mismo no pudo ser totalmente removido luego del lavado, mientras que diluciones mayores (1:50 y 1:100) no resultaron efectivas en la marcación de los espermatozoides en suspensión. Por lo tanto, fue ésta la dilución utilizada en el estudio de migración previamente descripto.

Tal como se muestra en la Tabla III.6, el porcentaje de espermatozoides con DE localizada en el segmento ecuatorial al ser el anticuerpo removido a los 20 minutos de incubación (58.5%) no resultó menor que aquel obtenido para los espermatozoides capacitados por 5 hs y luego sometidos a la técnica corriente de IIF (52%). Estos resultados indicaban que el fenómeno de redistribución era, al menos en parte, consecuencia de la migración de moléculas de DE previamente expuestas en la membrana de los espermatozoides.

Sin embargo, existía la posibilidad de que la redistribución hallada entre los espermatozoides incubados con anti-DE al inicio de la capacitación, hubiera ocurrido durante los primeros 20 minutos de incubación con el anticuerpo. Para descartar esta posibilidad, los espermatozoides se fijaron inmediatamente después de la incubación con anti-DE, y luego se trataron con el

Tabla III.6. Migración de la proteína DE durante el proceso de capacitación *in vitro*.

Tratamiento	% de espermatozoides con marca en el SE
No capacitados	3.0 ± 1.0
Capacitados 5 h	52.0 ± 4.0
Anti-DE 20 min, capacitados 5 h	58.5 ± 5.1
Anti-DE 20 min	6.5 ± 0.7

(SE) segmento ecuatorial
 Los espermatozoides fueron incubados bajo condiciones capacitantes *in vitro*, recuperándose muestras al comienzo (No capacitados) y al final (Capacitados, 5 h) de la incubación, las cuales fueron fijadas, y utilizadas para analizar el porcentaje de espermatozoides con DE localizada en el SE. Para evaluar la ocurrencia del fenómeno de migración, los espermatozoides fueron incubados con anti-DE durante 20 minutos, lavados para remover el exceso de anticuerpo, capacitados por espacio de 5 h y finalmente fijados y tratados con anti-IgG de conejo-fluoresceinado (anti-DE 20 min, capacitados 5 h). Como control, los espermatozoides fueron incubados con anti-DE 20 min, fijados inmediatamente después y tratados con el segundo anticuerpo fluoresceinado (anti-DE 20 min). Los valores representan las medias ± E.S. de 4 experimentos independientes.

segundo anticuerpo fluoresceinado. Bajo estas condiciones, el porcentaje de células con la nueva localización de DE resultó sólo de un 6% (Tabla III.6), indicando que el anticuerpo no inducía la redistribución en los primeros 20 min de incubación.

III.3.2. Evaluación de la posible exposición de la proteína DE.

Los experimentos mencionados indicaban la existencia de un fenómeno de migración de moléculas, el cual sería responsable, al menos en parte, del cambio de localización de DE. Sin embargo, estos resultados no descartaban la posibilidad de que, paralelamente a esta migración, existiera un fenómeno de exposición de moléculas de DE durante el proceso de capacitación. En caso de existir un fenómeno de esta naturaleza, debería existir una población de DE localizada previamente en forma críptica en el segmento ecuatorial.

Con el objeto de investigar la posible presencia de una población de DE no expuesta en la superficie correspondiente al segmento ecuatorial, los espermatozoides no capacitados se trataron con distintos agentes permeabilizantes o proteasas, para ser posteriormente sometidos a la técnica de IIF. Tal como se muestra en la Tabla III.7, los tratamientos permeabilizantes tales como la secuencia de fijación metanol-acetona, el Tritón X-100 sobre espermatozoides fijados con p-formaldehído, o el congelamiento, no provocaron la aparición del nuevo patrón de localización de DE en espermatozoides no capacitados. Por otra parte, el tratamiento con agentes que podrían provocar el desenmascaramiento de antígenos previamente presentes en la membrana tales como las proteasas tripsina o pronasa (Tabla

Tabla III.7. Efecto de diversos tratamientos permeabilizantes y proteasas sobre la localización de DE en espermatozoides no capacitados.

Tratamiento	% de espermatozoides c/marca	
	D	SE
Metanol / Acetona	96	3
p-formaldehído / Tritón X-100	93	7
Congelamiento	92	5
Tripsina	95	1
Pronasa	96	4

(D) región dorsal, (SE) segmento ecuatorial

Los espermatozoides fueron sometidos a los tratamientos indicados (ver descripción en Materiales y métodos), siendo posteriormente fijados con p-formaldehído 2 % en PBS en los casos de tratamiento por congelamiento o con proteasas con el fin de ser utilizados para realizar la técnica de IIF, evaluándose el porcentaje de células con la proteína localizada en la región dorsal o en el segmento ecuatorial.

III.7) o, tal como fué indicado en la Tabla III.1, con ClNa 0.6 M, tampoco lograron inducir la aparición de DE en el segmento ecuatorial.

Como una aproximación alternativa al estudio de la posible existencia de un fenómeno de exposición, se inhibió la migración de DE provocando el entrecruzamiento de la proteína mediante la incubación con anti-DE seguido del acoplamiento del segundo anticuerpo-FITC divalente al inicio de la capacitación. Estos espermatozoides fueron posteriormente incubados bajo condiciones capacitantes durante 5 hs, fijados, y finalmente sometidos a la técnica de IIF corriente (anti-DE / 2do. anticuerpo-FITC). De este modo, dado que la migración se encontraba impedida a causa del entrecruzamiento provocado por el segundo anticuerpo, la aparición de marca en la región ecuatorial, luego de la IIF de los espermatozoides capacitados, indicaría la ocurrencia de la exposición de moléculas durante la capacitación.

Los resultados de estos experimentos se muestran en la Tabla III.8 e indicaron que, bajo estas condiciones, el porcentaje de espermatozoides con redistribución fue significativamente menor que el obtenido bajo condiciones controles (15.7% vs 53%).

El hecho de que la redistribución no se hubiera anulado completamente, podía deberse a la falta de una inhibición completa de la migración. Sin embargo, entre los espermatozoides que no fueron nuevamente sometidos a la IIF (y que habían sidomarcados al inicio de la incubación), se encontró solo un 1.6% de redistribución (Tabla III.8), indicando que la migración había sido completamente inhibida. Por lo tanto, la aparición de

Tabla III.8. Inhibición de la migración de DE por incubación con el segundo anticuerpo al inicio de la capacitación.

Tratamiento	% de espermatozoides con marca en el SE
1. Capacitados 5 h	53.0 ± 4.3
2. anti-DE 20 min, 2do. anticuerpo-FITC 20 min, capacitados 5 h, IIF.	15.7 ± 2.0 *
3. anti-DE 20 min, 2do. anticuerpo-FITC 20 min, capacitados, 5 h.	1.6 ± 2.3

(SE) segmento ecuatorial. (1.) Los espermatozoides fueron incubados bajo condiciones capacitantes *in vitro*, recuperándose muestras al final de la incubación, las cuales fueron fijadas, y utilizadas para analizar el porcentaje de espermatozoides con DE localizada en el segmento ecuatorial. (2.) Los espermatozoides fueron incubados con anti-DE durante 20 minutos, lavados para remover el exceso de anticuerpo, incubados con anti-IgG de conejo-FITC durante 20 min, lavados nuevamente y capacitados por espacio de 5 h. Al finalizar la incubación fueron fijados y sometidos a la técnica de IIF corriente. (3.) Idem 2., sólo que al finalizar la capacitación los espermatozoides fueron fijados y examinados directamente sin una nueva IIF. Los valores representan las medias ± E.S. de 3 experimentos independientes. * p < 0.001 vs 1.

un 15.7% de espermatozoides con redistribución entre aquellos que habían sido nuevamente incubados con primer y segundo anticuerpo al finalizar la incubación podía deberse a un desprendimiento parcial del segundo anticuerpo en cierta subpoblación de espermatozoides durante la incubación. En este caso, moléculas de DE que al inicio se encontraban inhibidas de migrar, podrían haberse desplazado al no encontrarse entrecruzadas por el segundo anticuerpo. Una segunda alternativa, aunque menos probable, consistiría en que cierta subpoblación de espermatozoides manifestara un fenómeno de exposición de moléculas de DE.

Aún si este fuera el caso, en conjunto, los resultados descriptos descartarían la posibilidad de que la nueva localización de DE fuera enteramente consecuencia de la exposición de la proteína en el segmento ecuatorial.

III.4. Vinculación entre la migración de DE y la ocurrencia de la reacción acrosomal

Los resultados descriptos en la sección III.2. indicaron que la migración de DE al segmento ecuatorial se produciría como consecuencia de un cambio funcional en los espermatozoides. Teniendo en cuenta que el porcentaje de espermatozoides con DE en el segmento ecuatorial aumentaba en función del tiempo de capacitación (Fig. III.7), podía postularse que la redistribución estuviera asociada al proceso de capacitación de los espermatozoides. Sin embargo, dado que este aumento resultaba también paralelo a la capacidad de penetración de ovocitos sin zona y, teniendo en cuenta que sólo luego de la ocurrencia de la

reacción acrosomal, los espermatozoides son capaces de fusionarse a los ovocitos, podía postularse que la migración de DE se relacionara más específicamente con la reacción acrosomal en sí. Con el objeto de investigar esta última posibilidad, se realizaron una serie de estudios en los cuales se analizó el efecto de la ausencia (en el medio de capacitación) de iones involucrados en la reacción acrosomal, así como también el efecto de distintos tratamientos inductores de dicha reacción, sobre la redistribución de DE.

III.4.1. Efecto de la falta de calcio y bicarbonato sobre la redistribución de DE.

Tal como ha sido mencionado en la Introducción, así como la presencia de Ca^{2+} extracelular es un requisito indispensable para la ocurrencia de la reacción acrosomal, el ión HCO_3^- ha sido recientemente descrito como otro de los iones involucrados en este proceso. Se analizó entonces, la influencia de estos iones sobre la redistribución de DE, como una primera aproximación al estudio de la posible asociación entre este fenómeno y la ocurrencia de la reacción acrosomal.

A. Influencia del calcio extracelular sobre la redistribución

En una primera serie de estudios, se investigó el efecto de la falta del ión calcio en el medio de capacitación sobre el porcentaje de espermatozoides con redistribución de DE. Estrictamente hablando, el medio utilizado consistió en un medio

"deficiente" de Ca^{2+} , ya que el quelante EGTA (ácido etilenglicol-bis(β -aminoetil eter) no fué incorporado debido a que su presencia provocaba una inhibición importante de la motilidad de los espermatozoides. Debido a ello, se empleó un medio RFM al cual no había sido agregado el ión calcio durante su preparación. Los resultados obtenidos (Tabla III.9), indicaron que la incubación en un medio deficiente en Ca^{2+} disminuyó significativamente el porcentaje de células con redistribución de DE con respecto al obtenido en un medio RFM completo utilizado como control (16.8% vs 52.4%).

B. Efecto de la falta de HCO_3^- sobre la redistribución de DE

Una vez establecida la necesidad de la presencia de Ca^{2+} extracelular como requisito para la ocurrencia de la redistribución de DE, se estudió el efecto de la ausencia del ión HCO_3^- en el medio de capacitación sobre la migración de DE al segmento ecuatorial.

Como es bien sabido, el HCO_3^- se encuentra involucrado en el mantenimiento del pH en el medio. Para eliminar esta variable, en el momento de la preparación del medio, el pH se ajustó mediante el agregado de NaOH 1 N, manteniéndose constante durante las horas de incubación debido al efecto del tampón HEPES incluido en el medio RFM.

Los resultados obtenidos (Tabla III.9) indicaron que la ausencia de HCO_3^- durante la incubación de los espermatozoides disminuyó significativamente el porcentaje de células con redistribución de DE con respecto al control (36.4% vs 52.4%).

Tabla III.9. Efecto de la falta de Ca^{2+} y HCO_3^- sobre el porcentaje de espermatozoides con redistribución de DE.

Condiciones de incubación	n° de exp	% de esp. c/marca en el SE	% motilidad
RFM completo	4	52.4 ± 4.2	60 - 70
RFM libre de Ca^{2+}	3	16.8 ± 6.4 *	70 - 90
RFM libre de HCO_3^-	4	36.4 ± 2.6 *	60 - 80

(SE) segmento ecuatorial

Los espermatozoides fueron recuperados del cauda epididimario e incubados en medio RFM completo, en medio RFM sin agregado de Cl_2Ca (libre de Ca^{2+}) o en medio RFM sin agregado de HCO_3Na (libre de HCO_3^-), durante un período de 5 hs bajo condiciones capacitantes, para ser posteriormente fijados y sometidos a la técnica de IIF. Finalmente, se evaluó para cada grupo el porcentaje de espermatozoides con la proteína DE localizada en el segmento ecuatorial. Los valores representan las medias ± E.S. del número indicado de experimentos independientes. * $p < 0.001$ según test de χ^2 comparado con los espermatozoides incubados en RFM completo.

Tal como fue mencionado en la Introducción, la presencia de calcio es imprescindible para la ocurrencia de la fusión entre el espermatozoide y el ovocito. A diferencia de lo que ocurre con el calcio, encontramos que el ión HCO_3^- no resulta imprescindible para este proceso. Esto pudo ser comprobado debido a que, tal como se muestra en la Tabla III.10, los porcentajes de penetración en un medio libre de este ión no fueron significativamente diferentes de aquellos encontrados en un medio RFM completo (67% vs 86%). Por lo tanto, fue posible estudiar en este caso, si la menor redistribución obtenida en ausencia de HCO_3^- durante la capacitación, se reflejaba en una disminución en la capacidad de fusión de estos espermatozoides.

Tal como se observa en la misma tabla, los resultados indicaron que cuando los espermatozoides fueron incubados en ausencia de

HCO_3^- , se producía una inhibición en la capacidad de fusión (4% vs 66.6%), sugiriendo que la inhibición de la migración de DE manifiestada en ausencia de HCO_3^- en el medio de capacitación, podía deberse a una inhibición de la reacción acrosomal.

III.4.2. Efecto de tratamientos inductores de la reacción acrosomal sobre la redistribución de DE.

Si bien la menor redistribución encontrada en ausencia de calcio y bicarbonato, se correspondía con una posible vinculación entre la migración de DE y la reacción acrosomal, resultaba interesante estudiar si tratamientos inductores específicos de la reacción acrosomal, provocaban un aumento en el porcentaje de espermatozoides con la proteína DE localizada en el segmento ecuatorial.

Tabla III.10. Efecto de la falta de HCO_3^- sobre la penetración de ovocitos sin zona pellucida.

medio de capacitación	medio de fusión	número de ovocitos	porcentaje de penetración
RFM completo	RFM completo	55	86.25 \pm 7.7
RFM completo	RFM sin HCO_3^-	40	66.60 \pm 11.8
RFM sin HCO_3^-	RFM sin HCO_3^-	51	4.0 \pm 2.2 *

Los espermatozoides fueron recuperados del cauda epididimario, para ser incubados bajo condiciones capacitantes por un período de 5 hs en medio RFM completo, o preparado sin la adición de HCO_3^- . Una vez concluído este período, los mismos fueron puestos en contacto con ovocitos sin zona pellucida en presencia o ausencia del ión HCO_3^- durante la fusión. Los valores representan las medias \pm E.S. de 5 experimentos independientes.

* $p < 0.001$ según test de χ^2 vs los dos controles con RFM completo como medio de capacitación.

A. *Efecto del ionóforo A23187 sobre la redistribución de DE.*

Tal como ha sido mencionado en la Introducción, el ionóforo de calcio A23187 induce la reacción acrosomal en los espermatozoides de todas las especies en las que ha sido estudiado su efecto.

Con el fin de estudiar si este agente provocaba la inducción de la migración de DE hacia el segmento ecuatorial, se capacitaron espermatozoides *in vitro* por espacio de 4 hs, luego de lo cual se procedió a agregar distintos volúmenes de una solución 100 mM de ionóforo A23187 en DMSO, obteniéndose concentraciones finales de 0.5, 1 y 5 μ M del ionóforo de calcio A23187 en el medio de capacitación. Como control se utilizó medio RFM o medio RFM conteniendo DMSO, utilizado para disolver el ionóforo .

Dado que el agregado del ionóforo (especialmente las concentraciones de 1 y 5 μ M) provocaba una disminución inmediata de la motilidad de los espermatozoides, existía la probabilidad de que el mismo hubiera ejercido un efecto tóxico sobre los espermatozoides. Si lo que ocurría era solamente una inhibición de la motilidad como consecuencia de la presencia del ionóforo, el lavado del mismo luego de haber ejercido su efecto inductor, debía revertir la inmotilidad de los espermatozoides.

Para evaluar esta última posibilidad, los espermatozoides fueron lavados a distintos tiempos luego del agregado del ionóforo (15, 30 y 60 min), y resuspendidos en medio RFM (previamente equilibrado y mantenido a 37°C) conteniendo 8 mg/ml de BSA. Posteriormente, la incubación prosiguió bajo las condiciones capacitantes mencionadas. Se analizó el porcentaje de espermatozoides móviles así como también el grado de motilidad, que presentaban los mismos tras el lavado del ionóforo a los distintos tiempos mencionados. En todos los casos la evaluación

fué realizada luego de 30 minutos de la remoción del mismo.

Tal como se indica en la Tabla III.11, se observó que, si el ionóforo era removido a los 15 min, la motilidad de los espermatozoides retornaba a niveles similares a los controles. Si el lavado se realizaba a los 30 min de haber agregado el ionóforo, la recuperación de motilidad no era total y, finalmente, luego de 60 minutos de incubación con ionóforo, los espermatozoides no recuperaron ningún tipo de motilidad. Los mismos resultados fueron obtenidos para las concentraciones de 1 y 5 μM de ionóforo, mientras que aquellos espermatozoides incubados con la menor concentración (0.5 μM), manifestaron cierta motilidad aún luego de 60 minutos de incubación con el ionóforo.

En base a los resultados obtenidos fue utilizado el esquema experimental que se describe a continuación, con el fin de evaluar el efecto del ionóforo sobre la redistribución de DE. Para ello, se capacitaron espermatozoides *in vitro* por espacio de 4 hs, luego de lo cual se procedió a agregar el ionóforo A23187, obteniéndose concentraciones finales de 0.5, 1 y 5 μM en el medio de capacitación. Luego de 15 minutos de su agregado, los espermatozoides fueron lavados, resuspendidos en medio RFM conteniendo 8 mg/ml BSA y finalmente incubados durante 30 minutos adicionales bajo las condiciones capacitantes mencionadas. Tras finalizar este período, los espermatozoides fueron fijados y sometidos a la técnica de IIF. Los resultados indicaron que, con todas las concentraciones utilizadas, se obtuvo un aumento significativo en el porcentaje de espermatozoides con redistribución de la proteína DE (Fig. III.8), llegando a obtenerse un porcentaje superior al 80% para la mayor

Tabla III.11. Efecto del lavado sobre la motilidad de espermatozoides tratados con ionóforo.

Tiempo de incubación con ionóforo (min)	grado de motilidad a los 30 min del lavado		% de esp mótiles	
	0.5 uM	1 - 5 uM	0.5 uM	1 - 5 uM
0	+++	+++	60 - 70	60 - 70
15	+++	+++ / ++	60 - 70	50 - 60
30	++ / +	++ / +	30 - 60	20 - 50
60	+		10 - 30	0

Los espermatozoides fueron capacitados *in vitro* durante 4 hs, para ser posteriormente incubados con distintas concentraciones del ionóforo A23197 (0.5, 1 y 5 uM) por distintos tiempos (15, 30 y 60 min). Una vez concluidos los períodos mencionados, los espermatozoides fueron lavados y resuspendidos en RFM conteniendo 8 mg/ml de BSA, prosiguiendo la incubación bajo las condiciones capacitantes mencionadas. Se analizó el porcentaje de espermatozoides mótiles así como también el grado de motilidad que presentaban los espermatozoides 30 minutos luego del lavado. El grado de motilidad de los espermatozoides se analizó en base a la siguiente escala subjetiva:

- +++ : motilidad progresiva y vigorosa
- ++ : motilidad progresiva débil
- + : motilidad vibrátil "in situ"
- : inmotilidad

concentración utilizada. Este aumento con respecto al control no fue observado al ser el ionóforo agregado en ausencia de calcio extracelular (53% vs 52%), lo cual indicaba que el efecto se encontraba específicamente mediado por este ión.

Teniendo en cuenta que sería necesaria la utilización de espermatozoides tratados con ionóforo en estudios posteriores, se quiso investigar si, así como en otras especies (Talbot et al., 1976; Watson y Plummer, 1986; Florman y First, 1988), el efecto inductor del ionóforo sobre la reacción acrosomal podía ser observado aún entre espermatozoides no capacitados. De ser así, no sería necesario someter a los espermatozoides a un período de capacitación previo para ser inducidos a reaccionar por ionóforo, resultando simplificado el esquema experimental. Para estudiar esta posibilidad, los espermatozoides directamente recuperados del cauda epididimario fueron tratados con ionóforo (concentración final: 5 μ M) siendo utilizado para ello el esquema experimental descrito anteriormente. Tal como es posible observar en la Fig. III.9, el tratamiento con ionóforo fué capaz de provocar la inducción de la redistribución aún en espermatozoides no capacitados. Sin embargo, a pesar de que el efecto obtenido, medido como el número de veces de estimulación, fué mayor entre los espermatozoides no capacitados (6.9 veces), que entre los capacitados por 4 hs (1.7 veces), sólo fue posible obtener, en el primer caso, un valor máximo de 49% de espermatozoides con redistribución. Teniendo en cuenta que, analizando los valores absolutos, el agregado de ionóforo A23187 a espermatozoides previamente capacitados por espacio de 4 hs permitía obtener la población con el mayor número de espermatozoides con la proteína DE localizada en el segmento

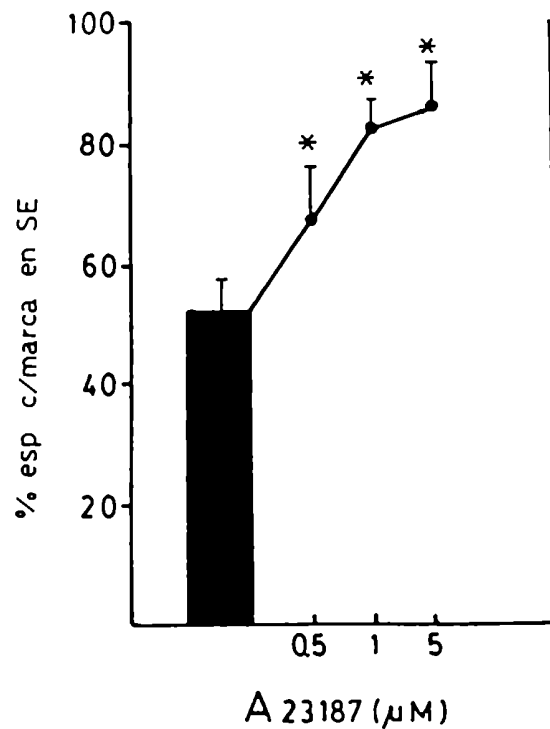


Fig. III.8. Efecto del ionóforo A23187 sobre la localización de la proteína DE. Los espermatozoides fueron capacitados *in vitro* por espacio de 4 hs, para ser posteriormente incubados con distintas concentraciones (0.5, 1 y 5 μM) del ionóforo de calcio A23187 utilizando el esquema experimental descrito en Materiales y Métodos. Como control, se presenta el medio RFM conteniendo DMSO. Al finalizar el período de incubación, los espermatozoides fueron fijados y sometidos a la técnica de IIF con el fin de evaluar el porcentaje de espermatozoides con DE localizada en el segmento ecuatorial.

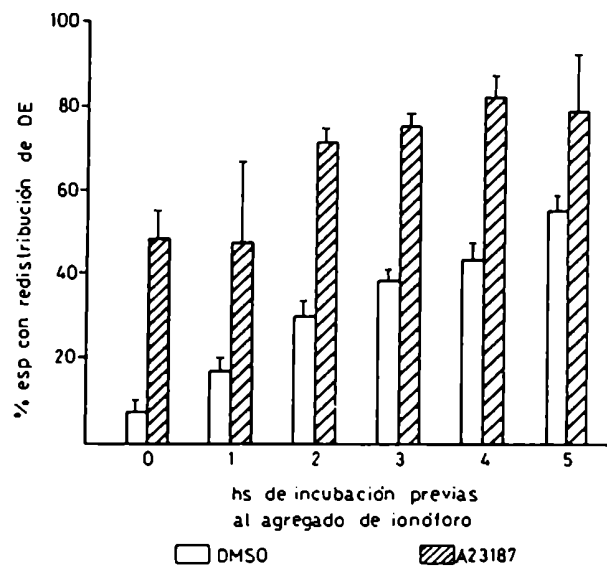


Fig. III.9. Efecto del ionóforo A23187 sobre la localización de la proteína DE en función del tiempo de capacitación. Los espermatozoides fueron incubados bajo condiciones capacitantes *in vitro* por espacio de 5 hs agregándose el ionóforo a distintas horas luego del inicio de la incubación (concentración final: 5 μ M) utilizando el esquema experimental descrito (ver Materiales y Métodos). Posteriormente, los espermatozoides correspondientes a cada horario fueron fijados y sometidos a la técnica de IIF con el fin de evaluar el porcentaje de espermatozoides con DE localizada en el segmento ecuatorial.

ecuatorial (83%), fue éste el esquema experimental utilizado en los estudios posteriores.

B. Efecto del congelamiento-descongelamiento de los espermatozoides no capacitados sobre la redistribución de DE.

Otro método de inducción de la reacción acrosomal en algunas especies, incluyendo la rata (Jones et al., 1990), es el sometimiento de espermatozoides no capacitados a ciclos de congelamiento y posterior descongelamiento. Cabe mencionar que, en forma diferente a la permeabilización provocada por el congelamiento como único tratamiento (sección III.3.2.), el posterior descongelamiento, conjuntamente con la reiteración de este ciclo, provoca la reacción acrosomal de los espermatozoides, inclusive entre espermatozoides no capacitados (Jones et al., 1990).

Con el fin de evaluar el efecto de este tratamiento sobre la localización de DE, espermatozoides recuperados del cauda epididimario, fueron sometidos al tratamiento mencionado y posteriormente fijados, para analizar la localización de DE en los mismos por IIF. Los resultados indicaron que el tratamiento de los espermatozoides con ciclos de congelamiento-descongelamiento provocó la redistribución de la proteína DE en un 78% de los espermatozoides no capacitados.

C. Inducción de la redistribución por agregado de zona pellucida.

Como se ha mencionado en la Introducción, la zona pellucida posee características inductoras de la reacción acrosomal, tanto en forma intacta como solubilizada, en todas las especies en las que se la ha ensayado hasta el momento. Resultaba interesante, por lo tanto, estudiar el efecto de la zona pellucida de rata sobre la redistribución de DE.

- Establecimiento de una técnica para la obtención de zonas pellucidas de rata.

Teniendo en cuenta que hasta el momento no había sido descrito para la rata un sistema de recuperación de zonas pellucidas en grandes cantidades, se realizaron una serie de ensayos preliminares tendientes a desarrollar una técnica adecuada para tal propósito.

Con esta finalidad, se comparó la eficiencia de recuperación obtenida al emplear dos técnicas diferentes de purificación de zonas, a partir de ovarios que habían sido previamente disgregados mecánicamente. Los dos procedimientos ensayados fueron:

- i) purificación de zonas por separación del tejido ovárico en gradientes de Percoll
- ii) purificación de zonas a partir de la filtración de tejido ovárico a través de mallas de nylon

A su vez, utilizando la técnica del filtrado, se comparó el número de zonas obtenido partiendo de ovarios de hembras prepúberes superovuladas con respecto al obtenido partiendo de hembras adultas que no habían sido sometidas al tratamiento hormonal.

Los resultados indicaron que, partiendo de ovarios de hembras adultas en ambos casos, la técnica de filtración permitió obtener un mayor rendimiento (60 - 80 zonas/ovario) que el procedimiento utilizando gradientes de Percoll (40 - 50 zonas/ovario). Por otro lado, al utilizar el sistema de filtración, con ovarios de hembras prepúberes superovuladas, siendo los ovarios recuperados luego de la ovulación, el número de zonas obtenido fue menor que en los dos casos mencionados (20 - 30). Sin embargo, debido a la gran disponibilidad de este último tipo de material en el laboratorio, también fueron utilizados estos ovarios para la purificación de zonas pellucidas.

En todos los casos, una vez obtenidas las zonas purificadas, las mismas fueron solubilizadas por tratamiento ácido y sometidas a un proceso de diálisis y liofilización (ver Materiales y Métodos).

- Efecto del agregado de zona pellucida sobre la redistribución de la proteína DE.

Una vez estandarizada la técnica de purificación de zonas pellucidas, se procedió a evaluar el efecto de su agregado, en forma solubilizada, sobre el porcentaje de espermatozoides con redistribución de DE. Cabe mencionar que en las distintas especies, el agregado de zona pellucida provoca la reacción acrosomal en un porcentaje que generalmente no supera el 50% de los espermatozoides previamente capacitados (Florman y First, 1988; Cherr y col, 1985; O'Rand y Fisher, 1987). Por lo tanto, se evaluó el efecto del agregado de zona a espermatozoides incubados previamente por 3 hs, siendo ésta la población de espermatozoides

capacitados que presentaba el menor porcentaje de células con redistribución.

Con esta finalidad, los espermatozoides fueron capacitados por espacio de 3 hs, luego de lo cual volúmenes de 10 μ l de los mismos fueron transferidos a tubos eppendorf conteniendo un volumen similar de medio, obteniéndose concentraciones finales de 5 y 10 zonas por μ l, y de 100 zonas/espermatozoide. La incubación prosiguió por espacio de una hora adicional bajo condiciones capacitantes, luego de lo cual los espermatozoides fueron fijados y sometidos a la técnica de IIF. En este caso, la técnica de IIF fué adaptada, tal como se describe en la sección de Materiales y Métodos, para ser utilizada con pequeños números de espermatozoides. Como control, se utilizó el medio de extracción de zonas (medio ZP) sometido a los mismos tratamientos de diálisis y liofilización.

Los resultados se muestran en la Tabla III.12 e indicaron que el agregado de 5 zonas/ μ l luego de 3 hs de capacitación provocó un aumento significativo en el porcentaje de espermatozoides con redistribución (50.7% vs 30.5%) siendo 66% el porcentaje de estimulación. Este efecto no se vió incrementado por la utilización de una concentración de 10 zonas/ μ l.

III.5. Características de la proteína DE localizada en el segmento ecuatorial.

Los resultados presentados permitieron evidenciar la existencia de un fenómeno de migración de la proteína DE hacia el

Tabla III.12. Efecto del agregado de zona pellucida solubilizada sobre la redistribución de DE.

Tratamiento	% de esp c/marca en segmento ecuatorial	(% estim)
Medio ZP	30.5 ± 3.4	
ZP + 5 zonas/u1	50.7 ± 2.5 *	(66%)
ZP + 10 zonas/u1	45.0 ± 2.9 *	(47%)

Los espermatozoides se capacitaron por espacio de 3 hs, luego de lo cual fueron transferidos a tubos eppendorf conteniendo 5 y 10 zonas/u1, obteniéndose una concentración final de 100 zonas/esp. La incubación prosiguió por una hora adicional bajo condiciones capacitantes, siendo los espermatozoides finalmente fijados y sometidos a la técnica de IIF adaptada para pequeños números de espermatozoides (ver Materiales y Métodos), evaluándose el porcentaje de espermatozoides con redistribución de DE. Se incluyen los porcentajes de estimulación obtenidos al comparar los valores de redistribución hallados entre espermatozoides tratados con zona pellucida solubilizada y aquellos tratados con medio de solubilización de zonas (medio ZP) utilizado como control. Los valores representan las medias ± E.S. de 3 experimentos independientes. * p < 0.001 según test de χ^2 vs medio ZP.

segmento ecuatorial bajo condiciones capacitantes *in vitro*, el cual, de acuerdo a los experimentos descritos en la sección III.4. se encontraría asociado a la ocurrencia de la reacción acrosomal.

Resultaba interesante, en este punto, realizar una serie de estudios comparativos entre la proteína reconocida por anti-DE en el segmento ecuatorial de los espermatozoides reaccionados y aquella localizada en la región dorsal de los espermatozoides no capacitados.

Tal como se mencionó en la sección III.4.2., el tratamiento de espermatozoides previamente capacitados por 4 hs con ionóforo A23187 provoca la redistribución de DE en la mayoría de los mismos. Por lo tanto, fue éste el esquema experimental utilizado para los estudios que se describen a continuación.

III.5.1. Movilidad electroforética de la proteína DE localizada en el segmento ecuatorial.

Teniendo en cuenta que la redistribución de DE se produciría en forma concomitante con el desencadenamiento de la reacción acrosomal, momento en el cual se produce una gran activación de enzimas como fosfolipasas y proteasas, se decidió investigar si la proteína DE presente en el segmento ecuatorial de los espermatozoides reaccionados presentaba alguna alteración en su peso molecular con respecto a la presente en los espermatozoides no capacitados.

Con esta finalidad, se procedió a inducir la reacción acrosomal en los espermatozoides mediante el tratamiento con ionóforo

A23187. Al finalizar la incubación, los espermatozoides fueron recuperados con el fin de realizar la extracción de las proteínas de membrana mediante un tratamiento con Tritón X-100. Las proteínas extraídas fueron separadas por electroforesis en un gel de poliacrilamida no desnaturizante, transferidas a nitrocelulosa y reveladas inmunológicamente utilizando anti-DE como primer anticuerpo. Con el fin de corroborar la eficiencia de la técnica de extracción, una vez finalizado el tratamiento con Tritón X-100, los espermatozoides fueron fijados y sometidos a la técnica de IIF, comprobándose la ausencia completa de marca en el 100% de los espermatozoides analizados.

Teniendo en cuenta que durante la capacitación de los espermatozoides se producía una pérdida importante de la proteína DE, el medio recuperado de la capacitación de los espermatozoides fue sometido al procedimiento de separación electroforética y posterior inmuno-electrotransferencia con el fin de detectar en el mismo la presencia de DE.

Los resultados se muestran en la Fig. III.10, en la cual se observa que la proteína proveniente de los espermatozoides incubados con ionóforo y, por ende, localizada en el segmento ecuatorial, posee idéntica movilidad electroforética en geles de poliacrilamida no desnaturizantes que la proteína DE extraída de espermatozoides no capacitados y localizada en la región dorsal de los mismos. En la misma figura es posible observar la aparición de la proteína DE en el medio de capacitación.

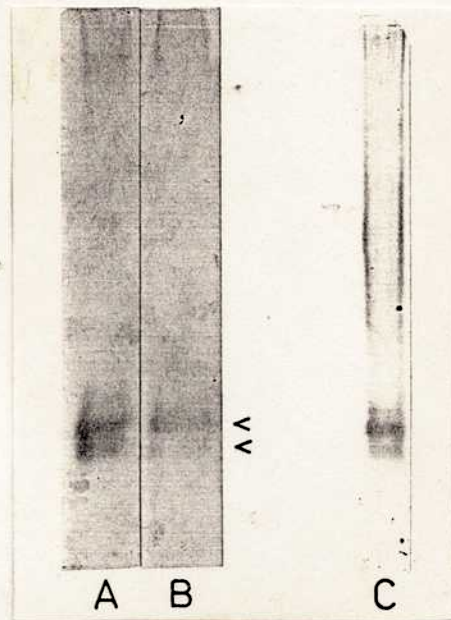


Fig. III.10. Movilidad electroforética de la proteína DE presente en la superficie de espermatozoides tratados con ionóforo A23187. Muestras correspondientes a proteínas de membrana (obtenidas por extracción con Tritón X-100) provenientes de espermatozoides no capacitados (A), de espermatozoides capacitados 4 hs *in vitro* con posterior tratamiento con ionóforo A23187 5 μ M (B), y correspondientes al medio en el cual procedió la capacitación de los espermatozoides (C), fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida nativos, transferidas a nitrocelulosa y reveladas inmunológicamente utilizando anti-DE como primer anticuerpo.

III.5.2. Análisis de la cantidad de proteína DE presente en espermatozoides tratados con ionóforo A23187.

Los estudios descriptos en la sección III.2.3. permitieron corroborar la pérdida de una gran proporción de DE luego de un proceso de capacitación *in vitro*. Dado que bajo estas condiciones era posible encontrar alrededor de un 50% de espermatozoides con redistribución, no era posible determinar si la pérdida encontrada se producía como consecuencia de la capacitación, o si la liberación de DE al medio de capacitación resultaba coincidente con su migración al segmento ecuatorial. Se propuso entonces investigar esta última posibilidad, realizando un análisis de la cantidad de proteína remanente en espermatozoides tratados con ionóforo luego de ser sometidos previamente a un proceso de capacitación *in vitro*.

Para ello, espermatozoides epididimarios fueron capacitados *in vitro* por espacio de 4 hs, para ser posteriormente incubados con ionóforo A23187 (5 μ M) utilizando el esquema experimental descrito anteriormente. Tras ser sometidos al tratamiento mencionado, los espermatozoides fueron fijados y acoplados a placas de ELISA con el fin de proceder a la cuantificación de la proteína DE presente en la superficie de los mismos.

Los resultados se muestran en la Fig. III.11 en la cual se incluyen, los resultados obtenidos para los espermatozoides capacitados sin un posterior tratamiento con ionóforo (ya descriptos en la Fig. III.5). Tal como es posible observar en la figura mencionada, el tratamiento de los espermatozoides capacitados con ionóforo A23187, provocó una pérdida adicional de un 25% de la proteína DE con respecto a los espermatozoides

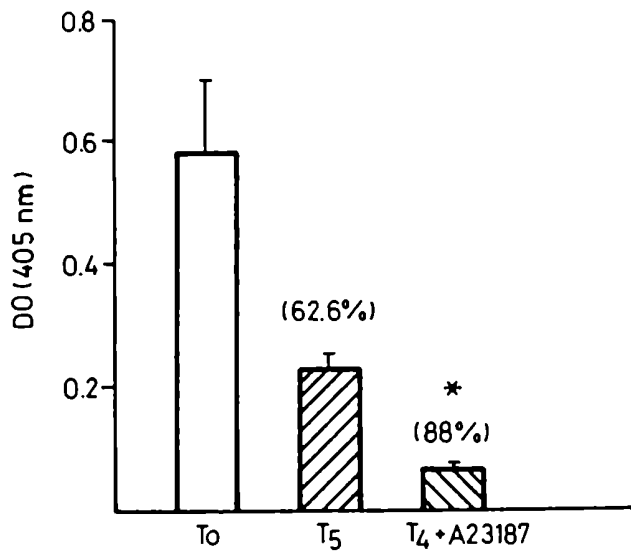


Fig. III.11. Ensayo de ELISA sobre espermatozoides tratados con ionóforo A23187 luego de la capacitación. Espermatozoides directamente recuperados del cauda epididimario previo a su capacitación (T₀), capacitados *in vitro* por espacio de 5 hs (T₅) o capacitados 4 hs y posteriormente tratados con ionóforo A23187 5 μ M (T₄ + A23187), fueron fijados y acoplados a placas de ELISA con el fin de proceder a la cuantificación de la proteína DE presente en la superficie de los mismos. Entre paréntesis figuran los porcentajes de pérdida correspondientes con respecto a los espermatozoides no capacitados.

Se grafica la absorbancia medida (D.O. a 405 nm) para cada una de las muestras mencionadas. Los resultados corresponden a las medias \pm E.S. de 3 experimentos independientes. (* P < 0.02 según test de Student).

capacitados pero no expuestos al ionóforo. Estos resultados evidenciaron la existencia de una pérdida de DE en forma coincidente con su migración al segmento ecuatorial.

III.5.3. Redistribución de la proteína DE en espermatozoides sometidos a alta fuerza iónica.

Los resultados descriptos en la sección anterior permitieron demostrar la existencia de una pérdida significativa del contenido de DE en la superficie de los espermatozoides capacitados e inducidos a reaccionar por tratamiento con ionóforo. Teniendo en cuenta la existencia de las ya mencionadas dos poblaciones de DE unidas diferencialmente a la membrana de los espermatozoides, una posible alternativa consistía en que la población débilmente unida fuera aquella liberada durante la capacitación. En caso de ser así, la población fuertemente unida sería la que permanecería unida a la superficie luego de la capacitación, siendo visualizada en la región correspondiente al segmento ecuatorial.

Con el fin de estudiar esta posibilidad, espermatozoides recuperados del cauda epididimario fueron tratados con ClNa 0.6 M extrayéndose de este modo las proteínas débilmente unidas a la membrana. Posteriormente, los espermatozoides fueron incubados bajo condiciones capacitantes por espacio de 5 hs para ser finalmente fijados y sometidos a la técnica de IIF.

Tal como se muestra en la Tabla III.13, luego de que los espermatozoides tratados con ClNa 0.6 M fueron incubados bajo condiciones capacitantes, se obtuvo un 91% de espermatozoides con

redistribución de DE. Por lo tanto, estos resultados estaban indicando que la proteína no removible por alta concentración iónica fué capaz de cambiar su localización durante la incubación bajo las condiciones mencionadas. Por otro lado, dado que el tratamiento en sí sobre los espermatozoides no capacitados no produce la aparición de DE en el segmento ecuatorial (6% vs 1%, Tabla III.13), es necesaria la incubación de los espermatozoides bajo condiciones capacitantes para que se manifieste la redistribución de la proteína fuertemente unida a la membrana.

Un hecho interesante consistió en que, tal como se puede observar en la misma tabla, el porcentaje de células con redistribución hallado entre los espermatozoides tratados con fuerza iónica y posteriormente incubados bajo condiciones capacitantes, fué mayor que el obtenido para espermatozoides solamente sometidos a un proceso de capacitación *in vitro* por 5 hs (91% vs 53%), sugiriendo que el tratamiento mencionado provocaría un aumento en la capacidad de los espermatozoides de sufrir la redistribución de DE.

III.1. Comportamiento de la proteína DE bajo condiciones capacitantes in vivo.

III.6.1. Establecimiento de los sistemas a utilizar para la capacitación in vivo.

Los resultados descriptos en los puntos anteriores indicaron la existencia de un fenómeno de migración de la proteína DE hacia el segmento ecuatorial bajo condiciones capacitantes *in vitro*, fenómeno que se produciría conjuntamente con la ocurrencia de la

Tabla III.13. Localización de la proteína DE fuertemente unida a la membrana luego de una incubación bajo condiciones capacitantes *in vitro*.

Tratamiento de los espermatozoides	% de espermatozoides c/marca	
	D	SE
RFM, 0 hs	98	1
RFM, 5 hs	45	53
ClNa 0.6 M, RFM 5 hs	7	91
ClNa 0.6 M, RFM 0 hs	94	6

(D) región dorsal de la cabeza del espermatozoide.
 (SE) segmento ecuatorial del espermatozoide.

Espermatozoides recuperados del cauda epididimario tratados con ClNa 0.6 M o no sometidos a este tratamiento, fueron incubados bajo condiciones capacitantes *in vitro* por espacio de 5 hs, luego de lo cual fueron fijados y sometidos a la técnica de IIF, evaluándose el porcentaje de espermatozoides con marca en la región dorsal o en el segmento ecuatorial. Se representan las medias de 3 experimentos independientes.

reacción acrosomal. Resultaba interesante entonces, estudiar si el fenómeno de redistribución de la proteína DE se producía también bajo condiciones capacitantes *in vivo*.

Teniendo en cuenta que la capacitación de los espermatozoides se completa en el oviducto, y con el fin de investigar la localización de DE luego de un proceso completo de capacitación *in vivo*, resultaba necesario realizar una IIF sobre espermatozoides recuperados del oviducto. Un hecho importante a considerar era que, tal como se ha mencionado en la Introducción, el número de espermatozoides que llegan a la ampulla luego de un apareo o inseminación es muy bajo, razón por la cual fué necesario utilizar un esquema que permitiera recuperar un número suficiente de espermatozoides para realizar los estudios mencionados. Un sistema con dichas características consistía en la inseminación de los espermatozoides en el momento de la ovulación, tal como lo describieran Shalgi y Kraicer (1978) para la rata.

En estos ensayos, resultaba ventajoso el empleo de hembras prepúberes, debido a que la superovulación (y, por ende, el momento de su ovulación) es provocada mediante la administración de hormonas en forma exógena sin tener en cuenta los ciclos hormonales del animal. A su vez, dado que era necesario utilizar ovocitos en varios de los estudios *in vivo*, el empleo de este tipo de hembras resultaba también ventajoso debido a que el número de ovocitos obtenidos de las hembras prepúberes superovuladas es mucho mayor que el obtenido mediante el empleo de animales adultos.

En esta serie de estudios se utilizaron tanto espermatozoides epididimarios como eyaculados con el fin de comparar los

resultados obtenidos. Mientras que la obtención de espermatozoides eyaculados capacitados se realizó por el sistema de apareo, la capacitación *in vivo* de los espermatozoides epididimarios se realizó mediante la inseminación artificial uterina de los mismos. Como ha sido mencionado, en ambos casos se utilizaron hembras prepúberes en el momento de su ovulación.

Dado que la ocurrencia de la capacitación *in vivo* solamente podía verificarse a través de la presencia de ovocitos fertilizados en la ampulla, se realizaron una serie de ensayos preliminares tendientes a establecer los porcentajes de fertilización obtenidos al ser utilizados los dos sistemas mencionados.

Cuando se ensayó el sistema de inseminación artificial con hembras prepúberes en el momento de la ovulación, de un total de 40 hembras inseminadas artificialmente, solo un 47% presentaron ovocitos fertilizados, siendo 39.1% el porcentaje promedio de fertilización (Tabla III.14). Por lo tanto, para analizar los resultados obtenidos con espermatozoides epididimarios, sólo fueron utilizados aquellos espermatozoides recuperados de hembras que presentaran ovocitos fertilizados.

Con el fin de estudiar los resultados de los apareos con hembras prepúberes en el momento de su ovulación, fueron evaluados los resultados obtenidos al disponer 2 hembras con un macho en la misma jaula. Los mismos indicaron que, curiosamente, sólo un pequeño porcentaje (< 20%) de los machos probados había logrado aparear a las hembras. Con el fin de estudiar si estos mismos machos eran capaces de aparear hembras prepúberes en

Tabla III.14. Porcentajes de fertilización obtenidos mediante la inseminación ó apareo de hembras prepúberes en el momento de su ovulación.

sistema de inseminación	n° de hembras	% hembras c/ovocitos fertilizados	% de fertilización
Artificial uterina	40	47	39.1 ± 4.9
Apareo (2 hembras/macho)	34	52	91.4 ± 9.9
Apareo (1 hembra/macho)	11	90	90.3 ± 6.3

Las hembras superovuladas fueron inseminadas artificialmente en el útero, o puestas en apareo con machos probados (1 o 2 hembras por macho) a las 12 hs post-hCG (momento de su ovulación). Luego de 14 hs, las hembras fueron sacrificadas con el fin de recuperar los ovocitos presentes en el oviducto, los cuales fueron examinados en un microscopio de contraste de fase, evaluándose los porcentajes de fertilización obtenidos en cada caso.

forma sistemática, se realizó una segunda serie de apareos utilizando los mismos machos probados en la serie anterior (exitosos o no). Solamente fueron obtenidos resultados positivos con los machos que en la primera serie habían sido exitosos, indicando que no todos los machos eran capaces de aparear hembras prepúberes. Resultó necesario, por lo tanto, realizar una previa selección de los animales a utilizar en los estudios propuestos. Sin embargo, aún al ser utilizados los animales que habían demostrado ser exitosos apareando hembras prepúberes, en la mayoría de los casos sólo una de las dos hembras dispuestas por jaula resultaba apareada (Tabla III.14). Al ser colocados estos machos con una sola hembra por jaula, el porcentaje de hembras con ovocitos fertilizados ascendió a un 90% (Tabla III.14). En este caso, tampoco fueron considerados los resultados obtenidos con las hembras que no presentaron ovocitos fertilizados.

III.6.2. Localización de la proteína DE en espermatozoides capacitados *in vivo*.

Una vez establecidos los sistemas y las condiciones a utilizar para permitir la capacitación *in vivo* de los espermatozoides, se procedió a inseminar o aparear hembras bajo las condiciones mencionadas. Luego de un período de seis horas, las hembras fueron anestesiadas con el fin de proceder a la recuperación de los espermatozoides del oviducto. En este caso, no sólo se recuperaron aquellos espermatozoides que se encontraban libres en el fluido oviductal, sino también los asociados a las células del cumulus oophorus.

En primer lugar, se analizó el número de espermatozoides que permanecían con la proteína DE asociada a su superficie. Los resultados obtenidos fueron similares independientemente del tipo de espermatozoides utilizados (epididimarios o eyaculados), e indicaron que, así como había sido demostrado para los espermatozoides capacitados *in vitro*, no se verificó una disminución en el porcentaje de espermatozoides marcados luego de un proceso completo de capacitación *in vivo* (96% para espermatozoides del oviducto vs 99% para los controles, Tabla III.15).

El paso siguiente consistió en analizar el porcentaje de espermatozoides recuperados luego de un proceso de capacitación *in vivo*, que mostraban a la proteína DE localizada en el segmento ecuatorial. Nuevamente, los resultados obtenidos fueron similares entre los espermatozoides eyaculados y epididimarios. Tal como se describe en la Tabla III.15, el porcentaje de espermatozoides con DE localizada en el segmento ecuatorial resultó ser un 15% para los recuperados del oviducto y un 21% para aquellos asociados a las células del cumulus oophorus.

Cabe aclarar que la motilidad de los espermatozoides asociados al cumulus no pudo ser cuantificada ya que, si bien los espermatozoides mostraban un movimiento importante bajo lupa, (los batidos flagelares de los espermatozoides provocaban el movimiento de las células del cumulus), la motilidad disminuía notoriamente al ser los cumulus transferidos a portaobjetos para su posterior observación bajo el microscopio. A pesar de que tanto los portaobjetos como los cubreobjetos se encontraban mantenidos a 37°C, estos resultados podían estar indicando una sensibilidad peculiar de los espermatozoides de rata a

Tabla III.15. Localización de la proteína DE en espermatozoides recuperados del útero y oviducto luego de un proceso de capacitación in vivo.

Espermatozoides presentes en	n° exp	% esp marcados	n° esp c/redist ^a	% esp	% motil
			_____	c/marca	
			n° esp total	en SE	
cauda, 0 h	3	99	14/320	4	70 - 80
oviducto libres, 6 h	6	96	46/310	15	20 - 40
cumulus, 6h	6	98	25/121	21	
espacio perivitelino	3	100	11/ 11	100	0

(SE) segmento ecuatorial. (a) número de espermatozoides con la proteína DE redistribuida en el segmento ecuatorial.

* la motilidad de los espermatozoides asociados a las células del cumulus no pudo ser determinada (ver sección III.6.2.).

Hembras prepúberes superovuladas fueron inseminadas natural o artificialmente en el momento de su ovulación, siendo recuperados los espermatozoides libres del oviducto y aquellos asociados a las células del cumulus oophorus luego de un período de seis horas. Los ovocitos penetrados fueron recuperados luego de un período de 10 hs posteriores a la inseminación. En todos los casos se procedió a la fijación de las células, y posterior IIF, determinándose la localización de la proteína DE sobre los espermatozoides.

diferencias de temperatura como las existentes durante la transferencia de los mismos para su examinación.

Tal como ha sido mencionado en la Introducción, los espermatozoides que penetran el cumulus oophorus se encuentran completamente capacitados. Sin embargo, la proporción de espermatozoides asociados al cumulus que mostró redistribución de DE no superó el 21%. Estos resultados sugerían que bajo condiciones *in vivo*, al igual que lo observado en los experimentos *in vitro*, la redistribución de DE podría vincularse más específicamente con la ocurrencia de la reacción acrosomal.

Con el fin de confirmar esta hipótesis, se propuso realizar la técnica de IIF sobre una población de espermatozoides necesariamente reaccionados. Teniendo en cuenta la necesidad de la ocurrencia de la reacción acrosomal para penetrar la zona pellucida, se estudió la localización de DE en espermatozoides presentes en el espacio perivitelino de ovocitos penetrados.

Para ello, se realizaron apareos de hembras prepúberes superovuladas, con el fin de proceder a la recuperación de los ovocitos 10 hs luego de su ovulación. Una vez recuperados, los ovocitos fueron fijados y finalmente sometidos a la técnica de IIF. Al ser los mismos examinados en el microscopio, se hizo evidente un fenómeno de alta fluorescencia de fondo que en la mayoría de los casos no permitió visualizar fácilmente la localización de la marca sobre los espermatozoides perivitelinos. En sólo 11 ovocitos fué posible determinar inequívocamente la localización de DE sobre los espermatozoides presentes en el espacio perivitelino. En todos estos casos (100%) la proteína se hallaba localizada en el segmento ecuatorial de dichos

espermatozoides (Tabla III.15). En la Fig. III.12 se observa un ovocito penetrado presentando un espermatozoide perivitelino en el cual, debido a la baja fluorescencia de fondo, es posible distinguir a la proteína DE localizada en el segmento ecuatorial.

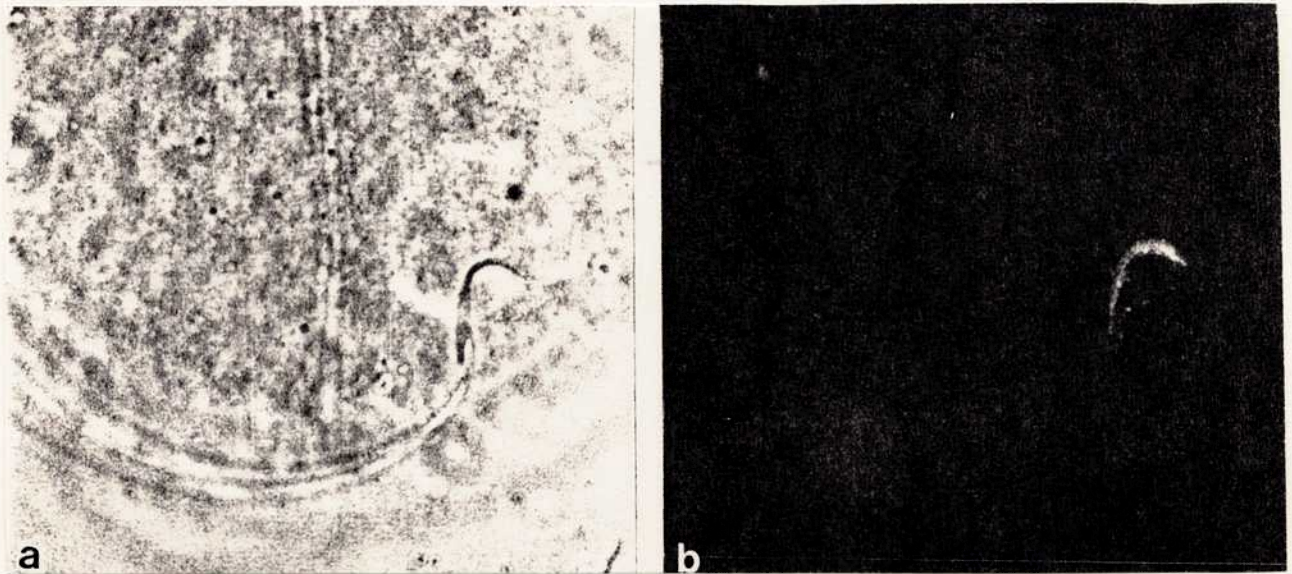


Fig. III.12. Localización de la proteína DE en espermatozoides presentes en el espacio perivitelino. Hembras superovuladas fueron puestas en apareo en el momento de su ovulación, siendo los ovocitos recuperados luego de un período de 10 hs posteriores al apareo, fijados y sometidos a una IIF.

La fotografía de la izquierda (a) corresponde a una observación en contraste de fase de un ovocito penetrado presentando un espermatozoide localizado en el espacio perivitelino. A la derecha (b), se observa la imagen del mismo ovocito, observada en microscopio de fluorescencia. En la misma es posible distinguir la marca fluorescente localizada en el segmento ecuatorial del espermatozoide perivitelino. Aumento: 625 x.

IV. Resultados
Segunda Parte

IV. RESULTADOS.

SEGUNDA PARTE: ESTUDIO DE LA FUNCION BIOLOGICA DE LA PROTEINA "DE".

IV.A. Estudio de la participación de DE en la interacción entre el espermatozoide y el ovocito.

Tal como ha sido descrito en la Primera Parte de este trabajo, la proteína DE permanece asociada a la superficie de los espermatozoides luego del proceso de capacitación y la ocurrencia de la reacción acrosomal, sugiriendo estos resultados una posible participación de DE en el proceso de fertilización en sí. Teniendo en cuenta que concomitantemente con la ocurrencia de la reacción acrosomal, la proteína DE migra hacia el segmento ecuatorial que es precisamente la región por la cual se produce la fusión del espermatozoide con la membrana plasmática del ovocito, se estudió la posible participación de DE en la etapa específica de fusión entre las gametas que ocurre durante el proceso de fertilización.

IV.A.1. Penetración de ovocitos sin zona pellucida en función de la concentración de espermatozoides.

Con el fin de evaluar la participación de la proteína DE en el proceso de fusión, los esquemas experimentales a ser utilizados debían incluir ensayos de penetración *in vitro* a ovocitos sin zona pellucida. Tal como ha sido mencionado en la Introducción, el bloqueo de polispermia a nivel de la membrana plasmática en el

ovocito de rata es parcial y por lo tanto se evaluó la posible influencia de la concentración de espermatozoides utilizados en la inseminación, sobre la penetrabilidad de los ovocitos.

Para ello, fueron evaluados los porcentajes e índices de penetración de ovocitos sin zona pellucida obtenidos al utilizar tres concentraciones diferentes de espermatozoides ($2 - 5 \times 10^5$, $0.5 - 2 \times 10^5$ y $2 - 5 \times 10^4$) durante la coincubación de las gametas.

Los resultados se muestran en la Tabla IV.1 en la cual es posible observar que, con la mayor concentración ($2 - 5 \times 10^5$) se obtuvo un 97% de penetración, siendo la mayoría de los ovocitos (98%) penetrados en forma polispérmica. Al ser utilizada una concentración intermedia, si bien el porcentaje de penetración se mantuvo alto (96%), se obtuvieron alternativamente situaciones de mono (41%) y polispermia (59%). Finalmente, al ser ensayada la menor concentración, si bien se lograba una condición de penetración prácticamente monospérmica (8% de ovocitos polispérmicos), el porcentaje promedio de penetración era de un 67.4%.

En la Fig. IV.1a se observa un ovocito penetrado por un único espermatozoide (penetración monospérmica). En la Fig. IV.1b se presenta un ovocito recuperado en un estadio más tardío, el cual se encuentra penetrado por dos espermatozoides, pudiendo ser visualizada la presencia de tres pronúcleos (dos masculinos y uno femenino). Las Figs. IV.c-d presentan ovocitos penetrados en forma polispérmica.

Tabla IV.1: Penetración de ovocitos sin zona pellucida en función de la concentración de espermatozoides.

Concentración de esp	n° ovo	% de penetración	% de polisp	índice de penetración
2 - 5 x 10 ⁵	142	97.0 ± 2.5	98.1 ± 1.3	5.8 ± 0.6
0.5 - 2 x 10 ⁵	65	95.6 ± 2.5	59.1 ± 13.5	2.0 ± 0.4
2 5 x 10 ⁴	91	67.4 ± 9.5	8.2 ± 6.0	1.2 ± 0.1

Espermatozoides provenientes del cauda epididimario fueron capacitados *in vitro* durante 5 horas, luego de lo cual fueron puestos en contacto con ovocitos sin zona pellucida en las distintas concentraciones indicadas. Los ovocitos fueron recuperados tras un período de 2 horas de incubación, analizándose los siguientes parámetros:

% de penetración:

n° de ov penetrados / n° de ov totales observados

% de polispermia:

n° de ov c/ más de 1 esp en el ooplasma / n° de ov penetrados

índice de penetración:

n° de esp en el ooplasma / n° de ov penetrados

Los valores representan las medias ± E.S. de 8 experimentos independientes. (ov) ovocito, (esp) espermatozoide

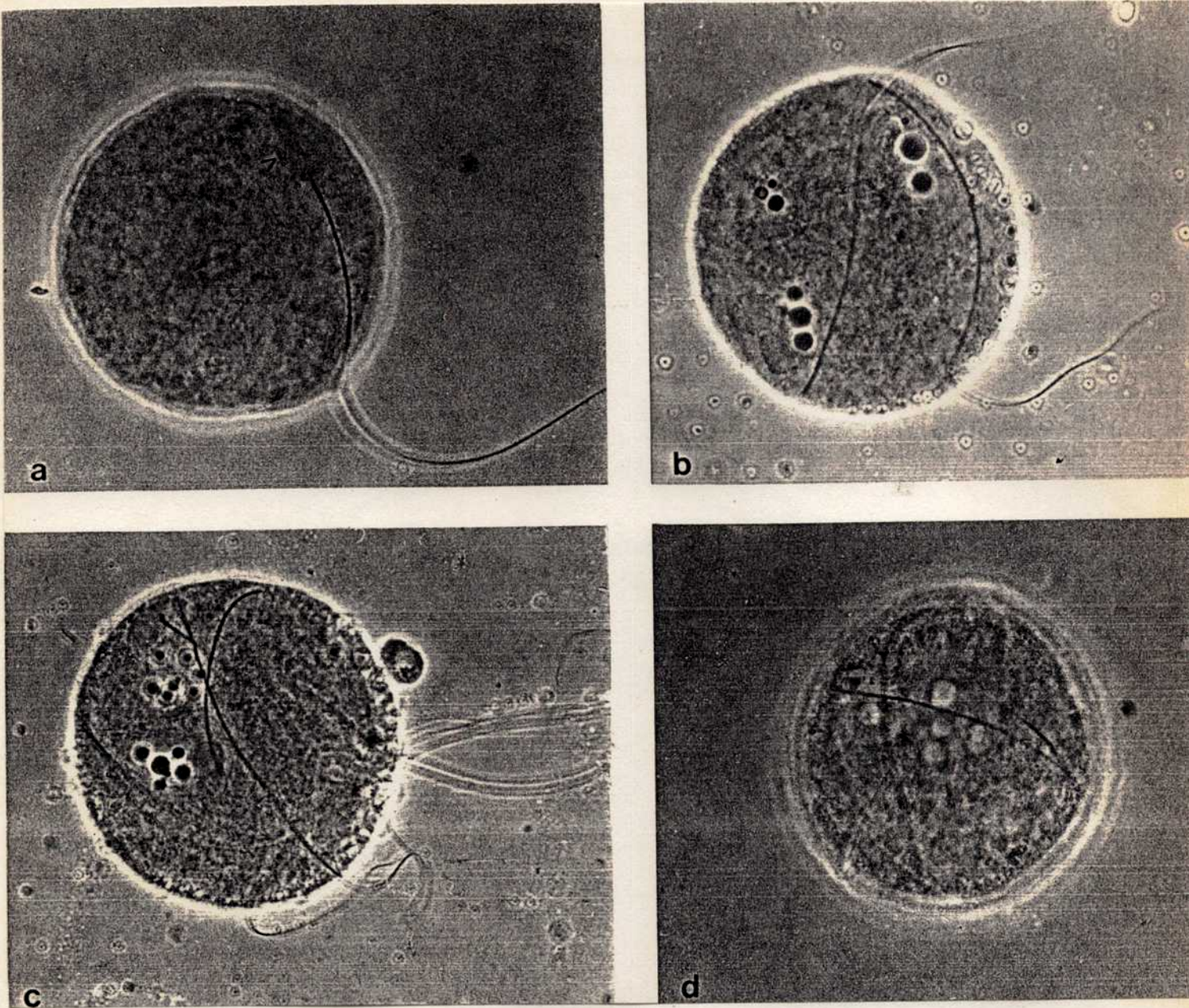


Fig. IV.1. Ovocitos sin zona pellucida de rata penetrados en forma mono y polispérmica. (a) Fotografía de un ovocito de rata penetrado en forma monospérmica. Con una flecha se señala la cabeza dispersa de un espermatozoide incorporado al ooplasma. (b-d) Fotografías de ovocitos penetrados en forma polispérmica: (b) Ovocito presentando dos espermatozoides incorporados al ooplasma, con sus correspondientes pronúcleos, conjuntamente con el pronúcleo femenino. (c-d) Ovocitos presentando varios espermatozoides incorporados al ooplasma.

En todos los casos los ovocitos fueron fotografiados en un microscopio de contraste de fase. Aumento: 250 x.

IV.A.2. Efecto del anticuerpo anti-DE sobre la penetración a ovocitos sin zona pellucida.

Con el fin de investigar la posible participación de DE en el proceso de fusión, se procedió a estudiar el efecto del anticuerpo anti-DE sobre la capacidad de penetración de espermatozoides maduros a ovocitos sin zona pellucida.

Para ello, espermatozoides provenientes del cauda epididimario fueron capacitados *in vitro* durante un período de 5 horas, luego de lo cual fueron incubados durante 20 minutos adicionales en presencia de anti-DE o de IgG de conejo normal, previo al agregado de los ovocitos sin zona pellucida. Fueron utilizadas tres concentraciones de anticuerpo (0.25, 0.5 y 1 mg/ml), las cuales se evaluaron en una primera serie de ensayos con la concentración de espermatozoides que permitía una penetración mayoritariamente monospermica. Como control, fueron utilizados espermatozoides incubados en medio conteniendo IgG de conejo normal (NIgG, 1 mg/ml) y espermatozoides incubados en medio libre de anticuerpo.

Los resultados se presentan en la Fig. IV.2 e indican que con una primera concentración de 0.25 mg/ml se obtuvo una reducción del 65% en el porcentaje de penetración (26% vs 75% de ovocitos penetrados), con la segunda concentración de 0.5 mg/ml el porcentaje de inhibición resultó similar al caso anterior (no se grafica en la figura) y finalmente se logró obtener un 90% de inhibición (7% vs 75% de ovocitos penetrados) en presencia de la mayor concentración de anticuerpo.

Con el fin de evaluar la especificidad de la inhibición

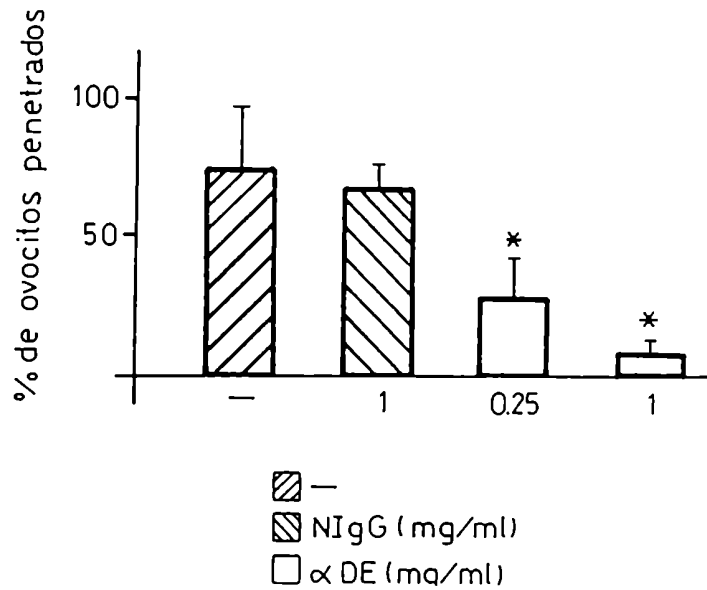


Fig. IV.2. Efecto del anticuerpo anti-DE sobre la penetración a ovocitos sin zona pellucida. Espermatozoides provenientes del cauda epididimario fueron capacitados *in vitro* durante un período de 5 horas, luego de lo cual fueron incubados en una concentración de $2 - 5 \times 10^4$ esp/ml, durante 20 minutos adicionales en presencia de anti-DE (α DE, 0.25 y 1 mg/ml) o de IgG de conejo normal (NIgG 1 mg/ml), o de medio RFM libre de anticuerpo (-), previo al agregado de los ovocitos sin zona pellucida. Luego de 2 hs de incubación con los espermatozoides, los ovocitos fueron recuperados y analizado el porcentaje de penetración. Se representan las medias \pm E.S. de 5 experimentos independientes.

* $p < 0.001$ según test de χ^2 vs NIgG y RFM libre de anticuerpo.

encontrada, se procedió a analizar el efecto del anticuerpo sobre:

- i) la motilidad de los espermatozoides
- ii) la viabilidad de los ovocitos

En el primer caso, se procedió a capacitar espermatozoides *in vitro* por espacio de 5 hs, para luego ser incubados con una concentración de anti-DE de 1 mg/ml durante 30 minutos adicionales. Al finalizar el período mencionado, la motilidad de los espermatozoides fue analizada bajo un microscopio de contraste de fase (500 x), así como también la posible formación de aglutinaciones celulares.

Los resultados demostraron que el anticuerpo no inhibía ni provocaba una alteración de la motilidad de los espermatozoides. Tampoco fue posible evidenciar la presencia de aglutinaciones de espermatozoides, siendo descartado un posible efecto aglutinante de anti-DE.

Con el fin de investigar un posible efecto tóxico del anticuerpo sobre los ovocitos en sí, los mismos fueron incubados por un período de 2 horas en RFM conteniendo 1 mg/ml de anti-DE, para ser posteriormente lavados y transferidos a gotas de medio fresco, siendo finalmente inseminados con espermatozoides previamente capacitados en medio libre de anticuerpo. Los resultados indicaron que la preincubación de los ovocitos sin zona con el anticuerpo durante el período mencionado no afectó el porcentaje de penetración de los mismos respecto del control (75% vs 73%) demostrando que la inhibición observada no se debió a un efecto de anti-DE sobre la penetrabilidad de los ovocitos.

Finalmente, teniendo en cuenta por un lado que el anticuerpo se agrega a los espermatozoides luego de la capacitación, y por otro lado que tal como fuera demostrado (sección III.3.1.), aún siendo agregado al inicio de la capacitación no inhibe el porcentaje de espermatozoides con redistribución de DE, se descartó la posibilidad de que la inhibición de la fusión fuera producto de una inhibición de la reacción acrosomal.

Con el objeto de estudiar si el agregado de las mismas concentraciones de anticuerpo provocaban la inhibición de la fusión aún en condiciones de penetración totalmente polispérmicas, se utilizó el esquema descrito anteriormente, con una concentración de espermatozoides 10 veces mayor.

Los resultados obtenidos (Tabla IV.2) indicaron que, si bien bajo estas condiciones no se manifestaba una disminución en el porcentaje de penetración en presencia del anticuerpo, existía una inhibición significativa concentración-dependiente del número de espermatozoides incorporados por ovocito, llegando a obtenerse un 65% de inhibición con una concentración de 1 mg/ml de anti-DE.

En conjunto, estos resultados constituyeron una importante evidencia a favor de una posible participación de la proteína DE en el proceso de fusión del espermatozoide con el ovocito.

IV.A.3. Efecto del anticuerpo anti-DE sobre la unión de los espermatozoides al oolema.

Tal como se ha mencionado en la Introducción, el proceso de

Tabla IV.2. Efecto del anticuerpo anti-DE sobre la fusión a ovocitos sin zona pellucida en condiciones de penetración polispérmica.

Anticuerpo	n° ovocitos	% de penetración	índice de penetración	% de inhibición
N IgG, 1 mg/ml	90	98.9 ± 1.2	6.5 ± 1.2	----
a-DE, 0.25 mg/ml	32	97.0 ± 4.2	3.6 ± 0.4 *	44.6
a-DE, 1.0 mg/ml	42	99.1 ± 2.0	2.3 ± 0.1 *	64.6

Espermatozoides provenientes del cauda epididimario fueron capacitados *in vitro* durante un período de 5 horas, luego de lo cual fueron incubados en una concentración de $2 - 5 \times 10^5$ esp/ml, durante 20 min adicionales en presencia de anti-DE (0.25 y 1 mg/ml) o de IgG de conejo normal (NIGG 1 mg/ml), previo al agregado de los ovocitos sin zona pellucida. Luego de 2 hs de incubación con los espermatozoides, los ovocitos fueron recuperados y analizado el porcentaje de penetración.

Se representan las medias ± E.S. de 3 experimentos independientes.

* $p < 0.001$ según test de ANOVA.

fusión se compone de dos etapas: una primera etapa de unión del espermatozoide a la superficie del ovocito, la cual resulta imprescindible para la ocurrencia de la segunda etapa, que es la fusión en sí de la membrana plasmática del espermatozoide con el oolema. Se propuso investigar entonces la posibilidad de que la proteína DE se encontrara involucrada en la primera etapa del proceso de fusión.

Con la finalidad de estudiar la participación de DE en esta primera etapa de unión de los espermatozoides a la membrana plasmática del ovocito, se procedió primeramente a determinar las características del fenómeno de unión de los espermatozoides al oolema. En particular, teniendo en cuenta que la aparición de la capacidad de fusión es dependiente de la capacitación (Fig. III.4), se investigó si la capacidad de unión a la superficie del ovocito resultaba también dependiente de este proceso.

Para ello, espermatozoides recuperados del cauda epididimario fueron incubados bajo condiciones capacitantes *in vitro* durante 5 hs y, a distintos tiempos luego de iniciada la incubación, los espermatozoides fueron recuperados y puestos en contacto con ovocitos sin zona pellucida. Luego de un período de 30 minutos (necesario para la ocurrencia de la unión al oolema), los ovocitos fueron lavados, fijados y examinados para evaluar el porcentaje de ovocitos con espermatozoides unidos en función del tiempo de capacitación.

Los resultados indicaron la necesidad de la ocurrencia de la capacitación para que los espermatozoides pudieran unirse a la membrana del ovocito (Fig. IV.3). Tal como se observa en la figura mencionada esta capacidad es adquirida luego de un período

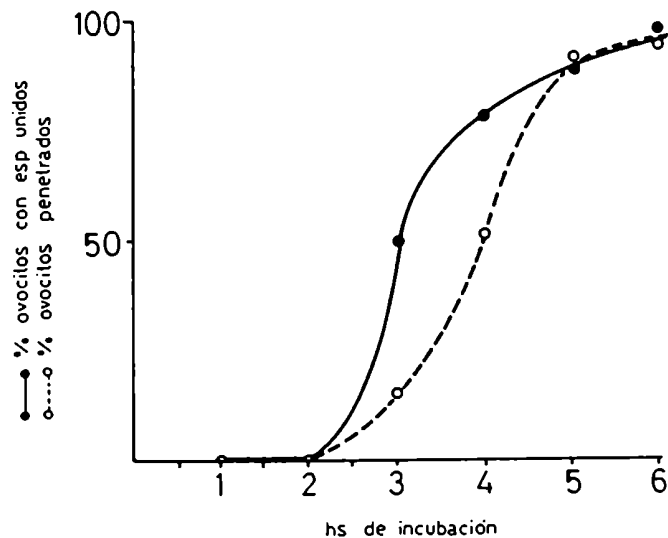


Fig. IV.3. Unión de espermatozoides al oolema en función del tiempo de capacitación. Espermatozoides recuperados del cauda epididimario fueron incubados bajo condiciones capacitantes *in vitro* durante 5 hs. A distintos tiempos luego de iniciada la incubación, los espermatozoides fueron recuperados y puestos en contacto con ovocitos sin zona pellucida. Luego de un período de 30 minutos, los ovocitos fueron lavados, fijados y examinados, determinándose el porcentaje de ovocitos con espermatozoides unidos en función del tiempo de capacitación (línea llena). En línea punteada se representa, a modo de comparación, el porcentaje de penetración de ovocitos sin zona pellucida presentado en la Fig. III.4.

de 3 horas de incubación bajo condiciones capacitantes y aumenta gradualmente en función del tiempo de incubación. En la misma figura se presentan los resultados ya descritos para la cinética de fusión *in vitro*, observándose que la aparición de la capacidad de unión al oolema coincide con el momento de aparición de la capacidad de fusión.

Con el fin de descartar la posibilidad de que a los 30 minutos de ser inseminados los ovocitos hubiera comenzado el proceso de fusión, y que de este modo se estuvieran evaluando como unidos a espermatozoides que ya hubieran iniciado la penetración del citoplasma, los ensayos de unión a la membrana del ovocito fueron realizados en ausencia de calcio extracelular, condición bajo la cual los espermatozoides pueden unirse al oolema sin que se produzca la fusión. Los resultados indicaron que los porcentajes e índices de unión observados a los 30 minutos de iniciada la coincubación de las gametas, fueron similares independientemente de la presencia o ausencia de calcio en el medio de incubación, resultando por lo tanto adecuado el criterio de evaluación de la unión a los 30 min, el cuál fué utilizado en todos los ensayos de realizados posteriormente.

La Fig. IV.4a muestra un ovocito recuperado a los 30 minutos luego de su inseminación con espermatozoides capacitados, presentando 2 espermatozoides unidos a su superficie. La Fig. IV.b presenta a un ovocito recuperado luego del mismo período, con 8 espermatozoides unidos a su superficie.

Una vez establecida la cinética de unión y su dependencia de la capacitación, se evaluó la posible participación de DE en esta

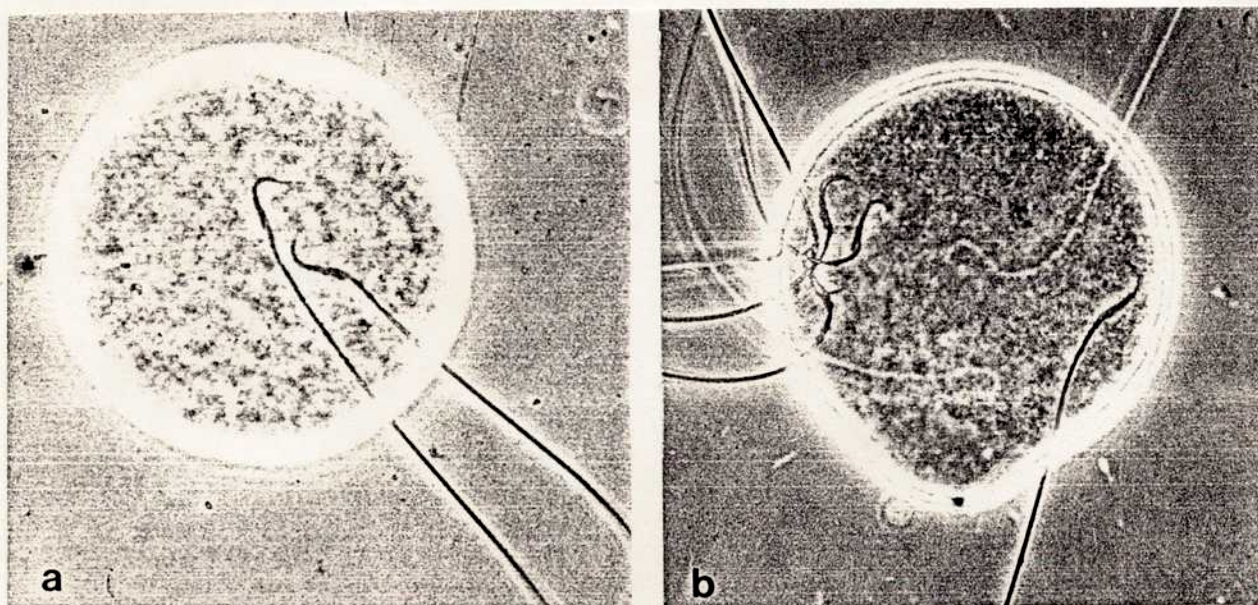


Fig. IV.4. Unión de espermatozoides a ovocitos sin zona pellucida. Fotografías en contraste de fase de dos ovocitos de rata sin zona pellucida, recuperados a los 30 minutos post-inseminación.

(a) Ovocito con 2 espermatozoides unidos a su superficie

(b) Ovocito con 8 espermatozoides unidos a su superficie.

Aumento: 250 x.

etapa del proceso de fusión, a través del estudio del efecto del anticuerpo anti-DE sobre la capacidad de unión de los espermatozoides al oolema. Con esta finalidad espermatozoides recuperados del cauda fueron capacitados *in vitro* por un período de 5 hs, luego de lo cual fueron incubados en una concentración de 2×10^5 esp/ml, durante 20 min adicionales, en presencia de distintas concentraciones de anti-DE o de IgG de conejo normal como control. Posteriormente, los ovocitos fueron agregados a las cápsulas conteniendo los espermatozoides capacitados.

Luego de un período de 30 min, los ovocitos fueron recuperados, lavados y finalmente fijados con el fin de evaluar el porcentaje de ovocitos que presentaba espermatozoides unidos a su superficie.

Los resultados se muestran en la Fig. IV.5 e indican que el anticuerpo inhibió significativamente el porcentaje de ovocitos con espermatozoides unidos pudiendo ser observado un 88% de inhibición con la mayor concentración de anticuerpo utilizada.

Los resultados descriptos permitieron establecer que la inhibición de la fusión provocada por la preincubación de los espermatozoides con anti-DE podía ser debida, al menos en parte, a una interferencia del anticuerpo con la etapa de unión de los espermatozoides al oolema, sugiriendo la posible participación de la proteína DE en dicha etapa.

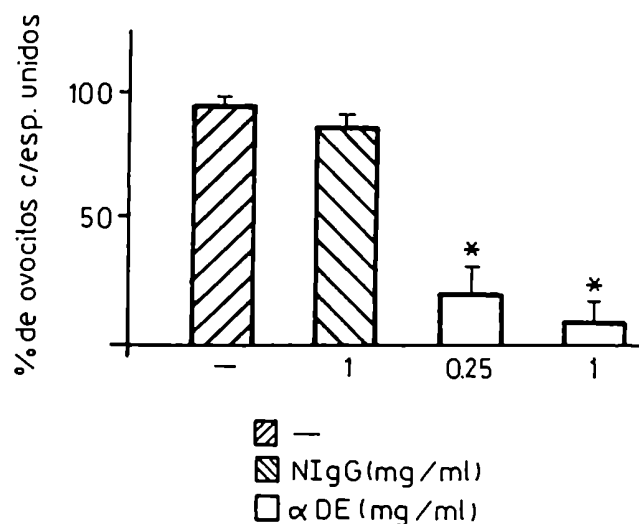


Fig. IV.5. Efecto del anticuerpo anti-DE sobre la unión de los espermatozoides al oolema. Espermatozoides recuperados del cauda epididimario fueron capacitados *in vitro* por un período de 5 hs, luego de lo cual fueron incubados durante 20 min adicionales en presencia de 0.25 y 1 mg/ml de anti-DE (α DE) o de IgG de conejo normal (NIGG, 1 mg/ml) o RFM libre de anticuerpo (-) como controles. Posteriormente, los ovocitos fueron agregados a las cápsulas conteniendo los espermatozoides capacitados y preincubados con anticuerpo. Luego de un período de 30 min, los ovocitos fueron recuperados, lavados y fijados, analizándose el porcentaje de los mismos con espermatozoides unidos a su superficie. Se representan las medias \pm E.S. de 5 experimentos independientes.

* $p < 0.001$ según test de χ^2 vs NIGG y RFM libre de anticuerpo.

IV.A.4. Efecto de la adición de proteína DE a ovocitos sin zona pellucida sobre el proceso de fusión.

Los resultados descriptos en la sección anterior indicaron una posible función de la proteína DE en el proceso de fusión del espermatozoide con el ovocito. Si DE se encontraba involucrada en este proceso a través de una posible interacción con componentes en el oolema, la adición de proteína purificada a los ovocitos en forma previa a su inseminación, debía inhibir competitivamente el proceso de fusión entre las gametas.

Con el fin de evaluar esta posibilidad, ovocitos sin zona pellucida fueron incubados con proteína DE purificada (0.02 y 0.2 mg/ml) durante 30 minutos, luego de lo cual los mismos fueron inseminados con espermatozoides previamente capacitados *in vitro*, evaluándose los porcentajes de penetración obtenidos luego de 2 hs de incubación. Como control fueron utilizados ovocitos preincubados en presencia de proteínas y glicoproteínas purificadas tales como anhidrasa carbónica, α -lactalbúmina, y ovoalbúmina.

Los resultados se muestran en la Fig. IV.6 e indicaron que la incubación de ovocitos sin zona pellucida con la mayor concentración de proteína DE purificada en forma previa a su inseminación, inhibió significativamente el porcentaje de penetración de los mismos (11% vs 84%).

Esta inhibición no fué debida a un efecto tóxico de la proteína sobre los ovocitos, ya que el lavado de los ovocitos incubados con DE en forma previa a su inseminación con espermatozoides capacitados, permitió su posterior penetración (Tabla IV.3),

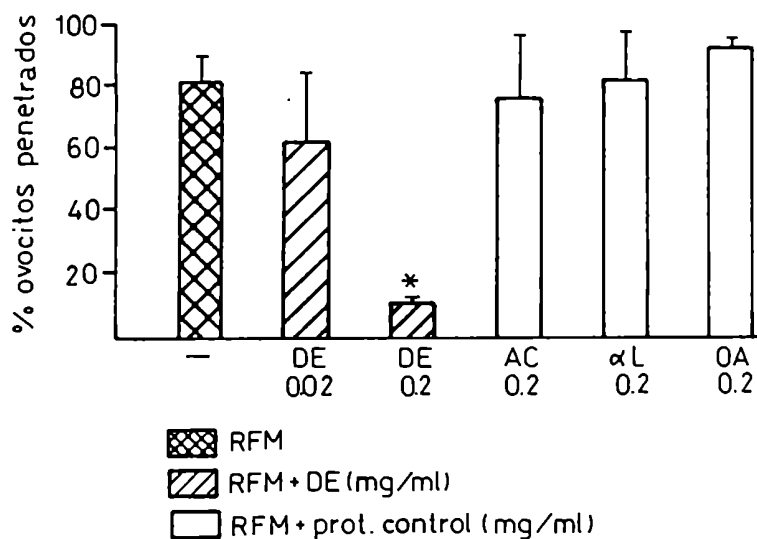


Fig. IV.6. Efecto de la adición de proteína DE a ovocitos sin zona pellucida sobre el proceso de fusión. Ovocitos sin zona pellucida fueron incubados con proteína DE (0.02 y 0.2 mg/ml) durante 30 minutos, luego de lo cual fueron inseminados con espermatozoides previamente capacitados *in vitro*, evaluándose los porcentajes de penetración luego de un período de 2 hs de coincubación. Como controles, fueron utilizados ovocitos preincubados en presencia de anhidrasa carbónica (AC), α -lactalbúmina (α L) y ovoalbúmina (OA), todas ellas en una concentración de 0.2 mg/ml.

Se representan las medias de 10 experimentos independientes.

* $p < 0.001$ según test de χ^2 .

Tabla IV.3. Penetración de ovocitos preincubados con DE luego del lavado y transferencia a RFM libre de proteína DE.

Tratamiento	n° de ovocitos	% de penetración	índice de penetración
RFM + OA 30 min /	18	93.2 ± 3.2 a	3.3 ± 0.6
RFM + DE 30 min /	19	11.1 ± 9.0 b	1.0
RFM + DE 30 min / lavado	20	91.1 ± 5.5 a	2.7 ± 0.9

Ovocitos sin zona pellucida fueron incubados durante 30 minutos con proteína DE (0.2 mg/ml, RFM + DE) u ovoalbúmina como control (0.2 mg/ml, RFM + OA). Posteriormente, los ovocitos fueron directamente inseminados con espermatozoides capacitados, o lavados por pasaje a través de varias gotas de RFM fresco y finalmente transferidos a una gota de medio libre de las proteínas mencionadas, para ser inseminados (lavado). Luego de un período de 2 hs de incubación, los ovocitos fueron recuperados y evaluados los porcentajes e índices de penetración para cada caso. Los valores representan las medias ± E.S. de 3 experimentos independientes, presentando diferente subíndice aquellos significativamente diferentes entre sí ($p < 0.001$) según test de χ^2 .

descartándose la posibilidad de que la incubación con la proteína hubiera ejercido un efecto irreversible sobre la penetrabilidad de los ovocitos.

Curiosamente, en forma diferente a lo observado en los experimentos de inhibición por anticuerpo (sección IV.1.3.), se encontró que, al finalizar la incubación del ensayo de fusión, aquellos ovocitos preincubados con DE y que no habían sido penetrados, presentaban espermatozoides unidos a su superficie. Teniendo en cuenta que la asociación de los espermatozoides a la membrana de estos ovocitos podía haber ocurrido tardíamente, en momentos en los que ya hubiera ocurrido la fusión en los controles, se propuso investigar cuál era la unión de espermatozoides a ovocitos preincubados con DE a los 30 minutos de ser inseminados. Como ha sido mencionado, un período de 30 minutos de incubación es suficiente para que se produzca la unión de los espermatozoides al oolema, sin que comience la fusión.

IV.A.5. Efecto de la adición de DE a ovocitos sin zona pellucida sobre la unión de espermatozoides capacitados.

Con el fin de estudiar el efecto de la preincubación de los ovocitos con DE sobre la unión de los espermatozoides al oolema, se realizó el ensayo de unión en presencia de esta proteína como así también en presencia de ovoalbúmina como proteína control.

Los resultados indicaron que, al cabo de 30 minutos de ser inseminados, el número de espermatozoides unidos a la superficie de los ovocitos preincubados con DE no difería significativamente de aquel encontrado entre los controles (Tabla IV.4).

Tabla IV.4. Efecto de la adición de proteína DE a ovocitos sin zona pellucida sobre la unión de los espermatozoides al oolema.

Tratamiento	n° de exp	n° de ovocitos	% de ovocitos c/esp unidos	índice de unión
RFM	4	37	82.7 ± 13.5	5.6 ± 2.5
RFM + DE	10	119	79.9 ± 8.9	4.3 ± 0.9
RFM + OA	11	70	97.7 ± 2.4	3.6 ± 0.5

Ovocitos sin zona pellucida fueron preincubados durante 30 minutos a 37°C en medio RFM, en medio RFM conteniendo 0.2 mg/ml de DE (RFM + DE) ó la misma concentración de ovoalbúmina (RFM + OA), para ser posteriormente inseminados con espermatozoides previamente capacitados *in vitro*. Luego de un período de dos horas de incubación, los ovocitos fueron recuperados, evaluándose tanto el porcentaje de ovocitos con espermatozoides unidos como el índice de unión.

Los valores representan las medias ± E.S. del número de experimentos indicados y no difieren significativamente entre sí (test de ANOVA).

En conjunto, estos resultados permitieron concluir que la interferencia provocada por la presencia de la proteína DE durante la interacción de las gametas era consecuencia de un efecto de la misma sobre alguno de los eventos posteriores a la unión de los espermatozoides al oolema.

Si el hecho de que los espermatozoides asociados al oolema no pudieran penetrar al ovocito era consecuencia de que la proteína DE presente en el medio, o interactuando con el oolema, estuviera inhibiendo un evento posterior a la unión de los espermatozoides, el lavado y posterior transferencia de los ovocitos con sus espermatozoides asociados a una gota de RFM libre de DE debía provocar la reversión de la inhibición.

Con el fin de investigar esta posibilidad, los ovocitos preincubados con DE fueron inseminados con espermatozoides capacitados, recuperados a los 30 min de incubación, lavados por pasaje a través de gotas de medio equilibrado y mantenido a 37°C bajo aceite, y finalmente depositados de una gota de RFM libre de DE y de espermatozoides. La incubación prosiguió por espacio de 2 horas, luego de lo cual los ovocitos fueron recuperados y analizado el porcentaje de penetración.

Los resultados se presentan en la Tabla IV.5, e indicaron que luego del procedimiento mencionado un 59.5% de los ovocitos preincubados con DE resultaron penetrados por los mismos espermatozoides que se encontraban unidos a su superficie. Por lo tanto, la ausencia de DE permitió a estos espermatozoides asociados al oolema, sufrir la fusión y posterior penetración de los ovocitos sin zona pellucida.

Tabla IV.4. Efecto del lavado sobre la capacidad de penetración de espermatozoides unidos a la superficie de ovocitos preincubados con DE.

Tratamiento de los ovocitos	n° de ovocitos	porcentaje de penetración
RFM	24	90.0 ± 6.1
RFM + DE	20	10.0 ± 14.0
RFM + OA	19	98.7 ± 8.9
RFM 30 min / lavado	15	83.3 ± 10.2
RFM + DE 30 min / lavado	13	59.5 ± 21.9 *
RFM + OA 30 min / lavado	18	80.0 ± 5.4

Los ovocitos fueron preincubados durante 30 min en medio RFM sin agregados, en medio RFM conteniendo 0.2 mg/ml de proteína DE (RFM + DE) o la misma concentración de ovoalbúmina (RFM + OA), para ser posteriormente inseminados con espermatozoides capacitados. Los mismos fueron incubados por espacio de 2 horas ó recuperados a los 30 min, lavados por pasaje a través de gotas de medio, transferidos a gotas de RFM sin agregados e incubados durante un período de dos horas (lavado). Luego del período mencionado, todos los ovocitos fueron recuperados y analizado el porcentaje de penetración.

IV.A.6. Estudio de la interacción de la proteína DE con la membrana plasmática del ovocito.

Los resultados descriptos, en los cuales la preincubación de los ovocitos sin zona pellucida con proteína DE provocaba una inhibición de la fusión, constituían un indicio de la posible existencia de sitios de interacción para la proteína en el oolema.

Se propuso investigar si, en caso de existir los sitios mencionados, los mismos podían ser visualizados por medio de una técnica inmunocitoquímica como lo es la técnica de IIF. Para ello, ovocitos provenientes de hembras superovuladas fueron recuperados y liberados sucesivamente de las células del cumulus y de la zona pellucida, para posteriormente ser incubados por espacio de 30 minutos con una concentración de 0.2 mg/ml de proteína DE. Al finalizar este período, los mismos fueron fijados y sometidos a un ensayo de IIF, utilizándose anti-DE como primer anticuerpo (o IgG de conejo normal como control), seguido de anti-IgG de conejo acoplado a fluoresceína. Un segundo control lo constituyeron ovocitos preincubados con una proteína control como la fibronectina (FN), utilizando el anticuerpo anti-FN durante la IIF. También fué realizado el mismo procedimiento con ovocitos preincubados con ovoalbúmina (0.2 mg/ml) ó sin preincubación previa.

Los resultados (Fig. IV.7) demostraron que solamente aquellos ovocitos que habían sido preincubados con DE, utilizando el anticuerpo anti-DE en la IIF, presentaron marcas fluorescentes distinguibles en la membrana. Curiosamente, la marcación hallada no se encontraba homogéneamente distribuida en la membrana, sino

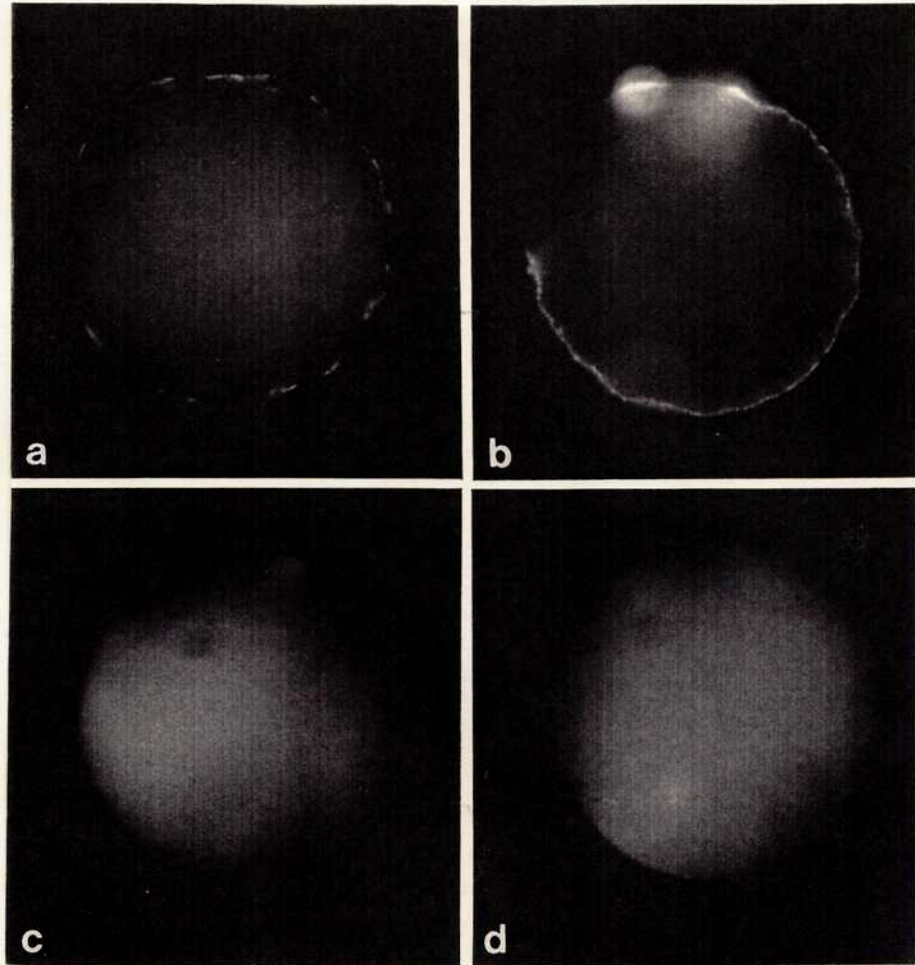


Fig. IV.7. Presencia de sitios de unión para la proteína DE en el oolema.

(a) Ovocitos sin zona pellucida incubados en medio RFM conteniendo 0.2 mg/ml de proteína DE por espacio de 30 minutos a 37°C, y posteriormente fijados y sometidos a la técnica de IIF utilizando anti-DE como primer anticuerpo.

(b) Idem (a) siendo realizada la incubación con la proteína DE a 4°C.

(c) Ovocitos sin zona pellucida incubados en medio RFM conteniendo 0.2 mg/ml de proteína DE por espacio de 30 minutos a 37°C, y posteriormente fijados y sometidos a la técnica de IIF utilizando IgG de conejo normal como primer anticuerpo.

(d) Ovocitos sin zona pellucida preincubados con fibronectina (0.2 mg/ml) durante 30 min a 37°C y expuestos al anticuerpo anti-FN durante la IIF.

Aumento: 250 x.

que era posible visualizar la presencia de áreas de mayor concentración de fluorescencia ("patches") en la periferia de los ovocitos (Fig. IV.7a). Con el fin de investigar si la marcación no homogénea (agrupada en ciertas áreas) era una consecuencia de un agrupamiento de los sitios presentes en el oolema (fenómeno conocido con el nombre de "patching"), provocado por el agregado de la proteína DE, la incubación fue realizada a 4°C, siendo ésta una temperatura que no permite la ocurrencia de los fenómenos de agregación. Tal como se observa en la Fig. IV.7b, los ovocitos incubados con proteína DE a baja temperatura presentaron una distribución de la marca fluorescente claramente más homogénea.

La Fig. IV.7c muestra un ovocito preincubado con DE y posteriormente tratado con IgG de conejo normal en la IIF, en el cual se puede observar la ausencia de las marcas descritas en los casos anteriores. En la Fig. IV.7d se presenta un ovocito preincubado con FN y posteriormente tratado con anti-FN en la IIF, mostrando características similares al control observado en la figura IV.7c. Cabe mencionar que los ovocitos que fueron preincubados con ovoalbúmina, o en medio RFM sin agregados, siendo posteriormente fijados y sometidos a la técnica de IIF utilizando a anti-DE como primer anticuerpo, no presentaron diferencias con respecto a los controles de la Fig. IV.7.

Cabe mencionar que, tal como se observa en la figura descripta anteriormente, tanto entre los ovocitos incubados con la proteína DE a 4°C como a 37°C, fué posible visualizar en todos los casos, un área donde la marca fluorescente era muy débil o se encontraba completamente ausente. En algunos ovocitos este área se encontraba asociada con una elevación de la superficie de los mismos (Fig. IV.8a). La tinción de los ovocitos que presentaban

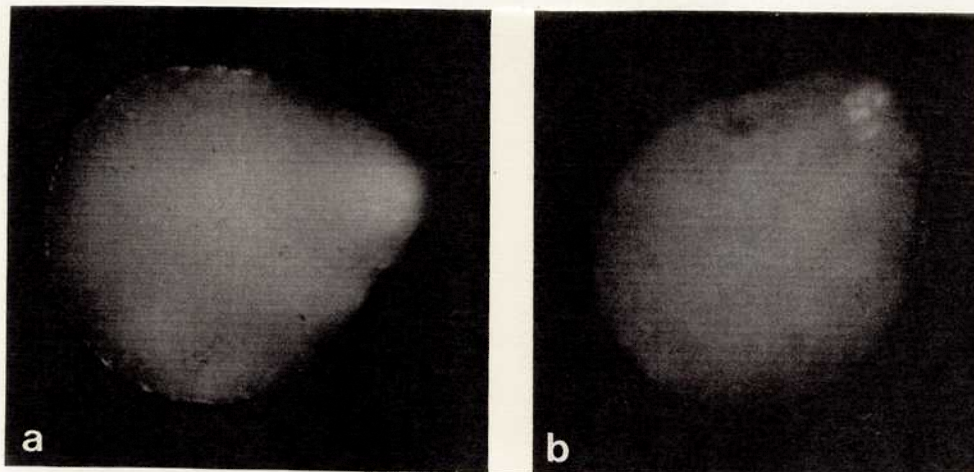


Fig. IV.8. Visualización de los cromosomas presentes en los ovocitos de rata mediante la tinción con naranja de acridina.

(a) Un ovocito sin zona pellucida preincubado con la proteína DE, presentando un área no marcada, coincidente con la región elevada de su superficie.

(b) Un ovocito sin zona pellucida sometido a la técnica de tinción con naranja de acridina, presentando a los cromosomas localizados en la región elevada de su superficie.

Aumento:250 x.

una elevación en su superficie, con un colorante vital como lo es el naranja de acridina (Johnson et al., 1975), reveló que el área "elevada" se encontraba consistentemente asociada con el subyacente huso mitótico (Figs. IV.8b).

Cabe recordar que, tal como fué mencionado en la Introducción, la fusión del espermatozoide con el ovocito no se produce a través de la región del oolema que cubre al huso meiótico, no siendo conocida hasta este momento la causa de este fenómeno.

En conjunto, los resultados descritos en esta sección apoyarían la posible presencia de sitios de interacción para la proteína DE en la membrana plasmática del ovocito.

IV.A.7. Presencia de antígenos reconocidos por anti-DE en espermatozoides de otras especies.

Tal como ha sido descrito anteriormente, sólo los espermatozoides de ratón y, en forma discutida, los de hamster, son capaces de fusionarse con los ovocitos sin zona pellucida de rata (Yanagimachi, 1988b). Resultaba interesante determinar entonces si los espermatozoides de ratón y hamster, poseían en la membrana de la región acrosomal, antígenos reconocidos por el anticuerpo anti-DE. Por otro lado, se probó el anticuerpo con espermatozoides que no tuvieran capacidad de penetración de ovocitos de rata como lo son los espermatozoides humanos (Quinn, 1982).

Con esta finalidad, se realizaron extendidos de espermatozoides de ratón, hamster y humano, los cuales fueron fijados e incubados con el anticuerpo anti-DE seguido del segundo anticuerpo acoplado a FITC.

Los resultados se muestran en la Tabla IV.6 e indican que el anticuerpo anti-DE mostró reacción cruzada con espermatozoides de ratón y hamster, con marcas en las regiones acrosomales de los espermatozoides de ambas especies. En particular, en el ratón la marca se localizó consistentemente en la región dorsal del acrosoma, mientras que en el hamster el área marcada con fluorescencia se encontraba más extendida hacia la región ecuatorial. Por el contrario, al ser utilizado anti-DE en una IIF con espermatozoides humanos, no se observó reacción del anticuerpo con los mismos.

Tabla IV.6. Reacción de anti-DE con espermatozoides de otras especies.

Espermatozoides provenientes de	penetración de ovocitos de rata	% esp marcados	localización de la marca
Rata	sí	99	Región dorsal del acrosoma
Ratón	sí	95	Región dorsal del acrosoma
Hamster dorado	sí	85	Región acrosomal
Humano	no	0	

Espermatozoides recuperados del cauda epididimario de rata, ratón y hamster y, espermatozoides eyaculados humanos fueron fijados con p-formaldehído 2% en PBS y sometidos a la técnica de IIF utilizando anti-DE como primer anticuerpo, seguido de una incubación con el segundo anticuerpo fluoresceinado.

IV.B. Estudio de la participación de la proteína DE en el proceso de maduración epididimaria.

Como ha sido mencionado en la Introducción, los espermatozoides adquieren capacidad fertilizante durante su tránsito por el epidídimo como consecuencia del fenómeno de maduración. Los cambios funcionales sufridos por los espermatozoides durante la maduración se manifiestan en las distintas etapas del proceso de fertilización: capacitación, reacción acrosomal, unión a la zona pellúcida, fusión con el oolema.

Tal como ha sido mencionado también, la proteína DE se asocia a los espermatozoides durante el tránsito epididimario. Teniendo en cuenta que los resultados presentados indicarían un papel de la proteína en la interacción entre las membranas del espermatozoide y el ovocito durante la fusión, se propuso investigar en primer lugar si la adquisición de capacidad de fusión en la rata ocurría durante la maduración y, de ser así, la posible vinculación entre la proteína DE y la adquisición de dicha capacidad de fusión.

IV.B.1. Capacidad de fusión al ovocito en función de la maduración de los espermatozoides.

En primer lugar, se determinó la capacidad de fusión al oolema presentada por espermatozoides provenientes de las distintas regiones epididimarias. Para ello, espermatozoides recuperados de las regiones del caput, corpus proximal, corpus distal y cauda (ver la delimitación de las regiones en Materiales y Métodos) fueron incubados bajo condiciones capacitantes *in vitro* por un período de 5 hs, luego de lo cual fueron puestos en contacto con

ovocitos sin zona pellucida con el fin de evaluar su capacidad de fusión.

Tal como puede observarse en la Fig. IV.9, los resultados obtenidos indicaron un aumento en la capacidad de fusión a medida que los espermatozoides provenían de regiones más distales del epidídimo.

Resultaba interesante evaluar si este aumento en la capacidad de fusión era debido a una mayor ocurrencia de la capacitación y/o reacción acrosomal entre espermatozoides con mayor grado de maduración. Teniendo en cuenta que la migración de DE hacia el segmento ecuatorial ocurría muy probablemente como consecuencia de la reacción acrosomal, se utilizó a la redistribución de esta proteína como marcador de la citada reacción. Por lo tanto, se determinó el porcentaje de espermatozoides con la proteína DE localizada en el segmento ecuatorial para muestras provenientes de sucesivas regiones del epidídimo incubadas bajo condiciones capacitantes por un período de 5 horas.

Tal como se describe en la Fig. IV.10, se observó un aumento gradual del porcentaje de espermatozoides con redistribución de DE a medida que los mismos provenían de regiones más distales del epidídimo. Al comparar los resultados de las Figs. IV.9 y 10 fue posible observar que, en el caso de los espermatozoides provenientes del caput y corpus proximal, la menor capacidad de fusión con respecto a los espermatozoides totalmente maduros, se correspondió con una menor ocurrencia de la capacitación y/o de la reacción acrosomal.

Sin embargo, tal como se observa la misma Fig. IV.10, los espermatozoides provenientes del corpus distal, a pesar de poseer

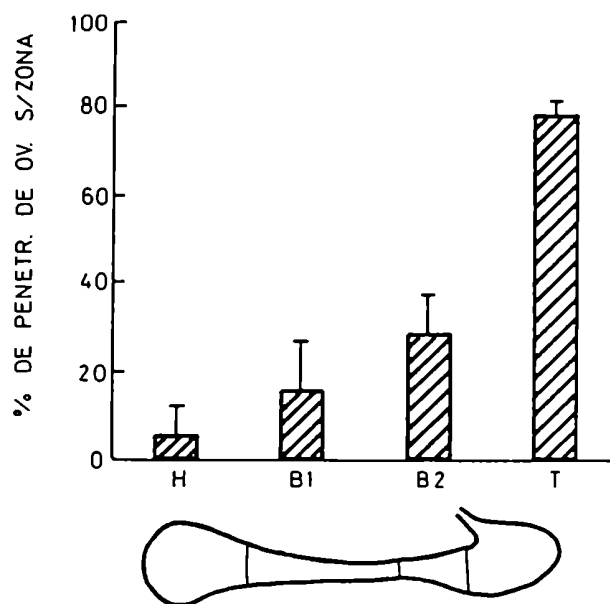


Fig. IV.9. Fusión a ovocitos sin zona pellucida en función del grado de maduración de los espermatozoides. Espermatozoides recuperados de las regiones del caput (H), corpus proximal (B1), corpus distal (B2) y cauda (T), fueron incubados bajo condiciones capacitantes *in vitro* por un período de 5 hs, luego de lo cual fueron puestos en contacto con ovocitos sin zona pellucida. Al cabo de 2 hs de incubación, los ovocitos fueron recuperados y evaluado el porcentaje de penetración obtenido con los espermatozoides de cada una de las regiones epididimarias mencionadas.

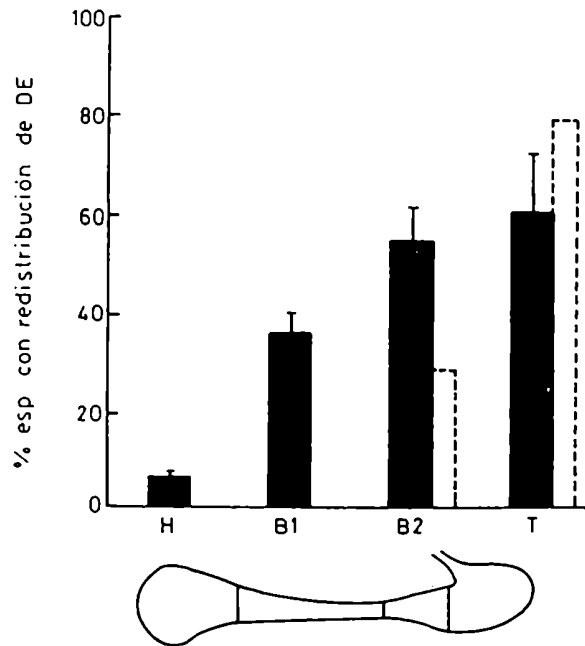


Fig. IV.10. Redistribución de la proteína DE en función del grado de maduración de los espermatozoides. Espermatozoides recuperados de las regiones del caput (H), corpus proximal (B1), corpus distal (B2) y cauda (T), fueron incubados bajo condiciones capacitantes *in vitro* por un período de 5 hs para ser posteriormente fijados y sometidos a la técnica de IIF. Se evaluó el porcentaje de espermatozoides con la proteína DE localizada en el segmento ecuatorial. En el caso de los espermatozoides recuperados del corpus distal y cauda se presentan, en barras punteadas, los porcentajes de penetración de ovocitos sin zona pellucida obtenidos para cada una de estas poblaciones (ver Fig. IV.9).

una menor capacidad de fusión que la correspondiente a los espermatozoides del cauda (mostrado en barras punteadas), presentaron porcentajes de redistribución similares a los encontrados para espermatozoides totalmente maduros, lo cual podía estar indicando una similar ocurrencia de reacción acrosomal entre estas dos poblaciones. En caso de que los espermatozoides provenientes del cauda y del corpus distal poseyeran una similar capacidad de sufrir esta reacción, los resultados indicarían que la menor capacidad de fusión presentada por esta última población podía ser consecuencia de una limitación existente en un evento posterior a la ocurrencia de la reacción acrosomal tal como lo es el proceso de fusión.

IV.B.2. Efecto de la proteína DE sobre la capacidad de fusión de espermatozoides del corpus distal.

Tal como ha sido descrito en las secciones anteriores, la proteína DE poseería una función específica en el proceso de fusión del espermatozoide con el ovocito. Teniendo en cuenta, por un lado, que la misma se asocia a los espermatozoides durante el proceso de maduración, y por otro, que espermatozoides inmaduros poseen una menor capacidad de fusionarse con el ovocito, se investigó si el agregado de la proteína DE a espermatozoides inmaduros aumentaba su capacidad de penetración de ovocitos sin zona pellucida. Dado que entre los espermatozoides provenientes de corpus distal se encontraban porcentajes similares de redistribución con respecto a aquellos totalmente maduros, se utilizó esta población para evaluar el efecto del agregado de la proteína. Con esta finalidad, los espermatozoides recuperados del

corpus distal fueron incubados bajo condiciones capacitantes *in vitro* en presencia de dos concentraciones de proteína DE (u ovoalbúmina como control), para luego ser puestos en contacto con ovocitos sin zona pellucida. Luego de una incubación de 2 horas, los ovocitos fueron recuperados y finalmente evaluados los porcentajes de penetración obtenidos.

Tal como se muestra en la Fig. IV.11, el agregado de la proteína DE, a espermatozoides provenientes del corpus distal, en una concentración de 40 ug/ml, aumentó significativamente el porcentaje de ovocitos penetrados (54% vs 27%) al utilizar una concentración .

Existía la posibilidad de que el efecto estimulador de DE sobre la capacidad de fusión de los espermatozoides, fuera debido a un efecto inductor sobre la capacitación y/o la reacción acrosomal. Con el fin de estudiar esta posibilidad, se midió el efecto del agregado de DE sobre el porcentaje de espermatozoides provenientes del corpus distal que presentaban a la proteína DE localizada en el segmento ecuatorial. Los resultados indicaron que la incubación en presencia de la proteína DE no produjo un aumento en el porcentaje de espermatozoides con redistribución (51% vs 54%) y, por lo tanto, no sería ésta la causa por la cual la proteína logró aumentar la capacidad de los espermatozoides inmaduros de penetrar ovocitos sin zona pellucida.

IV.B.3. Efecto de la proteína DE sobre la unión de los espermatozoides del corpus distal al oolema.

Los resultados descriptos en esta sección, señalarían a la

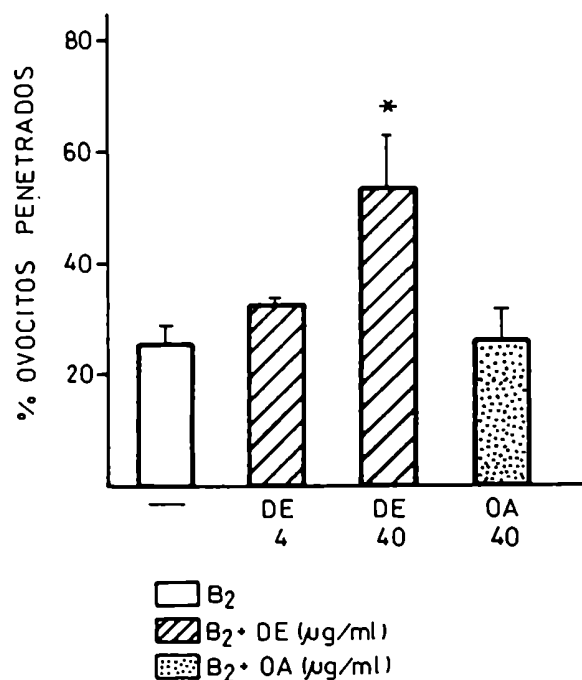


Fig. IV.11. Efecto del agregado de proteína DE a espermatozoides de corpus distal sobre su capacidad de fusión al oolema. Espermatozoides recuperados del corpus distal del epidídimo fueron incubados bajo condiciones capacitantes *in vitro* por 5 hs, en presencia de concentraciones de 4 o 40 ug/ml de proteína DE u ovoalbúmina (OA), así como también en medio RFM sin agregados, y finalmente fueron puestos en contacto con ovocitos sin zona pellucida. Luego de un período de dos horas, los ovocitos fueron recuperados, evaluándose los porcentajes de fusión obtenidos para cada caso. Se representan las medias \pm E.S. de 7 experimentos independientes.

* $p < 0.001$ según test de χ^2 .

proteína DE como un posible factor de maduración a través de su participación en la adquisición de capacidad de fusión. A su vez, los resultados presentados en la sección IV.1. indicaron una posible función de la proteína DE en la primera etapa del proceso de fusión como lo es la unión de los espermatozoides al oolema.

El paso siguiente consistió, por lo tanto, en estudiar si el aumento en la capacidad de fusión manifestado por los espermatozoides inmaduros al ser incubados en presencia de DE, era consecuencia de un efecto estimulador de la proteína sobre la capacidad de unión de los espermatozoides al oolema.

Para ello, en primer lugar, se procedió a investigar si la diferencia observada en la capacidad de fusión entre los espermatozoides de corpus distal y cauda se correspondía con una diferencia en la capacidad de unión de los mismos a la membrana plasmática de los ovocitos. Con esta finalidad, los espermatozoides provenientes de las distintas regiones epididimarias, fueron incubados bajo condiciones capacitantes *in vitro*, por un período de 5 hs, para luego ser utilizados en un ensayo de unión a ovocitos sin zona pellucida. Se analizó entonces el porcentaje de ovocitos con espermatozoides unidos para cada una de las poblaciones estudiadas.

Los resultados, presentados en la Fig. IV.12, demostraron la existencia de una mayor capacidad de unión al oolema por parte de los espermatozoides totalmente maduros con respecto a aquellos procedentes de las regiones más proximales. En particular, comparando estos resultados con los presentados en la Fig. IV.9, fue posible observar que el incremento en la capacidad de unión al oolema de los espermatozoides recuperados del cauda con respecto al corpus distal (83% vs 20% de ovocitos con

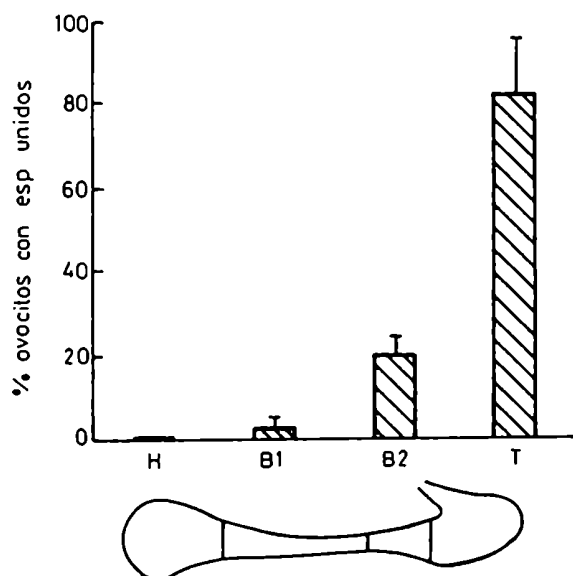


Fig. IV.12. Unión de los espermatozoides al oolema en función del grado de maduración. Espermatozoides recuperados de las distintas regiones epididimarias (H: caput, B1: corpus proximal, B2: corpus distal y T: cauda) fueron incubados bajo condiciones capacitantes *in vitro* por un período de 5 hs, luego de lo cual fueron puestos en contacto con ovocitos sin zona pellucida. Al cabo de 30 min de incubación, los ovocitos fueron recuperados y evaluado el porcentaje de ovocitos con espermatozoides unidos obtenido con los espermatozoides de cada una de las regiones epididimarias mencionadas.

espermatozoides unidos) fue del mismo orden que el incremento en la capacidad de fusión (4 veces para la unión vs B.4 veces para la fusión).

Se procedió entonces a estudiar el efecto del agregado de la proteína DE a espermatozoides del corpus distal, sobre la capacidad de unión de los mismos a la membrana plasmática del ovocito.

Para ello, se utilizó el mismo esquema experimental que en el caso anterior, sólo que los espermatozoides del corpus fueron incubados durante la capacitación en presencia de una concentración de DE similar a la que ejercía un efecto estimulador sobre la fusión. Estos espermatozoides fueron agregados a cápsulas conteniendo los ovocitos sin zona pellucida, evaluándose el porcentaje de ovocitos con espermatozoides unidos al finalizar un período de 30 minutos de incubación.

Los resultados se muestran en la Fig. IV.13 en la cual es posible observar que el agregado de proteína DE a los espermatozoides inmaduros provocó un aumento significativo en la capacidad de estos espermatozoides de unirse a la membrana plasmática del ovocito (57% vs 21% de ovocitos con espermatozoides unidos).

Estos resultados sugerirían la posible participación de la proteína DE en la adquisición de capacidad de fusión por parte de espermatozoides inmaduros. En base a los estudios presentados, esta participación podría ser consecuencia de al menos una función específica en la etapa de reconocimiento y unión de los espermatozoides al oolema, no pudiendo descartarse su posible participación en eventos posteriores, conducentes a la fusión en sí entre las gametas.

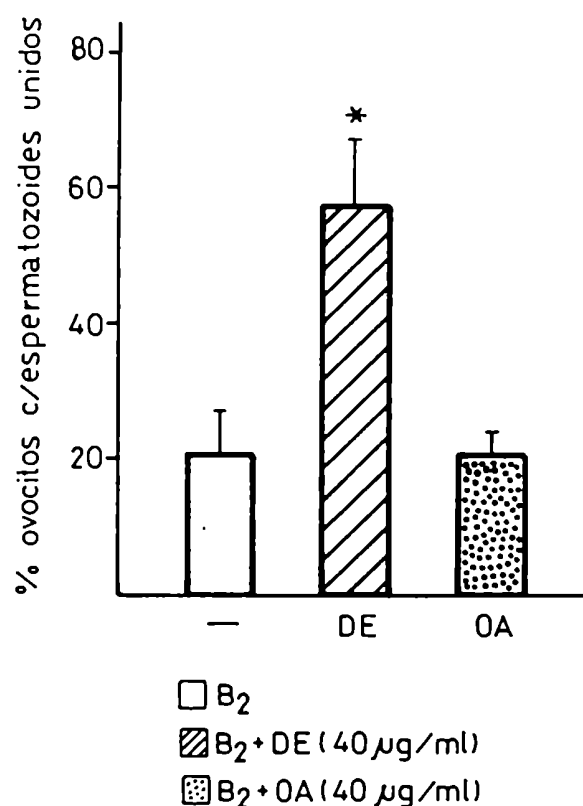


Fig. IV.13. Efecto del agregado de la proteína DE a espermatozoides del corpus distal sobre su capacidad de unión al oolema. Espermatozoides recuperados del corpus distal del epidídimo fueron incubados bajo condiciones capacitantes *in vitro* en presencia de 40 ug/ml de proteína DE u ovoalbúmina (OA) como control, así como también en medio RFM sin agregados, para luego ser puestos en contacto con ovocitos sin zona pellucida. Luego de un período de 30 minutos, los ovocitos fueron recuperados, lavados por pasaje a través de gotas de RFM y fijados, evaluándose finalmente el porcentaje de ovocitos con espermatozoides unidos al oolema.

Se representan las medias \pm E.S. de 5 experimentos independientes. * $p < 0.001$ según test de χ^2 .

V. Discusión

V. DISCUSION

Tal como ha sido mencionado en la Introducción, la proteína DE es sintetizada en los segmentos proximales del epidídimo y se asocia a la región dorsal del acrosoma de rata a medida que los mismos descienden por el conducto epididimario (Kohane et al., 1980b; Cameo et al., 1986).

Estudios previos realizados en el laboratorio habían demostrado la existencia de una gran pérdida de la proteína DE durante incubaciones *in vitro* e *in vivo*, sugiriendo que la misma podía tener una función como factor decapacitante (Kohane et al., 1980b). Por otro lado, estudios posteriores, utilizando técnicas de microscopía electrónica, revelaron la permanencia de DE en espermatozoides que habían sufrido la reacción acrosomal, lo cual podía estar indicando la posible participación de la proteína en el proceso de fertilización en sí.

El objetivo general del presente trabajo consistió en estudiar más profundamente el comportamiento de la proteína DE durante el proceso de capacitación de los espermatozoides, así como también su posible participación en el proceso de fertilización.

A su vez, teniendo en cuenta que la proteína DE se asocia a los espermatozoides durante su tránsito por el epidídimo, se propuso estudiar la existencia de una posible función para dicha proteína en el proceso de maduración de los espermatozoides.

En forma previa a la iniciación de estos estudios, se creyó interesante responder una serie de interrogantes con respecto a la proteína DE, que no habían sido investigados en los trabajos previos mencionados. Entre éstos, se propuso investigar si la

proteína DE asociada a la superficie de los espermatozoides presentaba alguna alteración con respecto a la presente en el epidídimo. Para ello se analizó si ambas proteínas poseían igual movilidad electroforética en geles no desnaturizantes, constituyendo éste un criterio de identidad entre las mismas. Así también, se propuso estudiar la movilidad en geles de poliacrilamida y la localización sobre los espermatozoides de las dos poblaciones de la proteína DE (fuerte y débilmente unidas a la membrana) descritas originalmente, para lo cual fue utilizado un anticuerpo policlonal específico contra DE.

Los resultados demostraron la identidad entre la proteína presente en el citosol epididimario y aquella asociada a la membrana de los espermatozoides, en base a sus características electroforéticas. A su vez, fué posible demostrar que las dos poblaciones de proteína reconocidas por anti-DE en la membrana de los espermatozoides (removible y no removible por alta fuerza iónica) poseían idéntica movilidad electroforética en geles de poliacrilamida no desnaturizantes.

Tal como ha sido mencionado en la Introducción, existen numerosos estudios en los cuales, fueron identificados componentes presentes en el fluido epididimario y sobre la membrana de los espermatozoides reconocidos por un mismo anticuerpo (Lea et al., 1978; Garberi et al., 1979; Brooks and Higgins, 1980; Brooks, 1981; Tezón et al., 1985b; Jones et al., 1985; Eddy et al., 1985). Sin embargo, en algunos de los estudios mencionados, en los cuales se investigaron también las características electroforéticas de estos componentes, se encontró que las formas secretadas por el epidídimo presentaban

diferencias en los pesos moleculares con respecto a las formas presentes sobre la superficie de los espermatozoides (Jones et al., 1985; Eddy et al., 1985). En base a estos trabajos, sus autores sugirieron la posibilidad de que las proteínas presentes en el fluido epididimario sufrieran modificaciones estructurales en el momento de su asociación con la membrana de los espermatozoides. Los resultados presentados en este trabajo, indicarían que no sería éste el caso de la proteína DE debido a que, tal como fué mencionado, la forma presente en el epidídimo y la asociada a los espermatozoides no serían diferenciables en cuanto a sus características electroforéticas.

Por otro lado, el hecho de que las poblaciones de proteína fuerte y débilmente unidas a la membrana poseyeran idéntica movilidad electroforética en geles nativos, conjuntamente con su similar localización en la región dorsal del acrosoma, podría estar indicando la posible existencia de dos mecanismos diferentes de transferencia e inserción a los espermatozoides para una misma proteína sintetizada en el epidídimo.

Si bien han sido descriptas proteínas de origen epididimario que permanecen tanto asociadas en forma intrínseca (Vernon, 1985; Hamilton, 1986) como en forma periférica (Rifkin & Olson, 1985) a la membrana plasmática del espermatozoide, hasta el momento no es bien conocido el mecanismo por el cual se produce la transferencia de proteínas sintetizadas en el epidídimo al espermatozoide. En el caso de aquellas proteínas epididimarias que permanecen asociadas en forma periférica a la membrana del espermatozoide, ciertos autores han postulado la existencia de receptores como mediadores de la unión de las mismas (Rifkin & Olson, 1985; Wong & Tsang, 1982). En particular, Wong y Tsang

(1982) demostraron la existencia en los espermatozoides de rata, de un receptor para una proteína de 32 K con similares características a la proteína DE. Otro mecanismo probable de asociación de proteínas de origen epididimario a los espermatozoides durante su tránsito por el epidídimo podría ser la inserción directa de proteínas presentes en el epitelio epididimario (sin ser secretadas previamente al lumen) a la membrana de los espermatozoides. Esta posibilidad se vería favorecida por los trabajos de Yanagimachi et al., 1985, que demuestran que durante el tránsito por el epidídimo, los espermatozoides del hamster chino se rodean de vesículas que se adosan a la membrana plasmática de los mismos, para posteriormente desaparecer en las regiones más distales del conducto epididimario y en el conducto deferente. Posteriormente, estudios de Burgos et al., (1990) en el cobayo, indicaron la existencia de una interacción directa del epitelio epididimario con la membrana de los espermatozoides de cobayo, resultando estos estudios una mayor evidencia a favor de un posible mecanismo de transferencia directa de elementos del epidídimo hacia los espermatozoides.

Como ha sido mencionado, el primer objetivo de este trabajo consistió en investigar el comportamiento de la proteína DE durante el proceso de capacitación de los espermatozoides. Tanto para la realización de estos estudios como para los estudios propuestos sobre la posible participación de DE en el proceso de fertilización, resultaba imprescindible contar con una técnica de capacitación y fertilización *in vitro* en la rata. Por lo tanto se realizaron una serie de experimentos tendientes a desarrollar las técnicas mencionadas. Tal como se mencionó en la sección de

Resultados, a pesar de que la reacción acrosomal se utiliza corrientemente como parámetro de evaluación de la capacitación, el capuchón acrosomal de los espermatozoides de rata es sumamente pequeño y su desprendimiento no puede ser visualizado por microscopía óptica ni aún con la ayuda de técnicas de tinción. Resultó necesario entonces, encontrar las condiciones adecuadas para la ocurrencia de la fertilización, no solamente para el estudio de la función biológica de DE, sino también para ser utilizada como parámetro de evaluación de la capacitación.

Con esta finalidad, se ensayaron un gran número de variables y condiciones experimentales, entre las cuales se incluyeron distintos tipos de medios, de albúmina, o de agua; espermatozoides epididimarios y eyaculados, ovocitos con o sin cumulus oophorus y obtenidos a diferentes horarios, e inclusive tanto recuperados del oviducto como extraídos directamente de los ovarios. A pesar de ello, los porcentajes obtenidos fueron sumamente bajos y los resultados irregulares debido a que los ovocitos generalmente no fueron penetrados, o lo fueron en muy bajos porcentajes. No sólo se obtuvieron resultados irregulares en la penetración de ovocitos, sino que tampoco fué posible observar entre aquellos no penetrados, espermatozoides asociados a la zona pellucida de los mismos.

Sin embargo, como consecuencia del encuentro casual de ovocitos penetrados que habían perdido en forma accidental la zona pellucida, se procedió a investigar si las condiciones ensayadas bajo las cuales no se producía la fertilización de ovocitos intactos, permitían la penetración de ovocitos sin zona pellucida.

Los resultados indicaron la ocurrencia de un 100% de

penetración de estos ovocitos en la mayoría de los casos. Teniendo en cuenta que la reacción acrosomal es un requisito indispensable para que se produzca la fusión del espermatozoide con el oolema (Yanagimachi, 1988b) los resultados mencionados indicaban la ocurrencia de la reacción acrosomal y, por ende, de la capacitación, entre los espermatozoides incubados bajo las condiciones descritas. A su vez, el hecho de que el porcentaje de ovocitos penetrados aumentara gradualmente en función del tiempo de incubación bajo condiciones capacitantes, resultaba una mayor evidencia a favor de la ocurrencia de la capacitación entre los espermatozoides.

Dado que estos espermatozoides, aún habiendo sufrido la reacción acrosomal, no eran capaces de unirse a la zona pellucida, una posible causa de la falta de fertilización podía ser la existencia de alteraciones en los ovocitos. Cabe mencionar que, tal como fue demostrado por Moller y Wassarman (1989) para el ratón, como consecuencia de la activación espontánea de los ovocitos, las enzimas contenidas en los gránulos corticales podrían ser liberadas y provocar alteraciones en los receptores presentes en la zona pellucida. Como consecuencia de estas alteraciones, los receptores de la zona perderían capacidad de unión a ligandos presentes en el espermatozoide. En este sentido, es importante mencionar que también en el caso de la rata ha sido descrita la ocurrencia de alteraciones en los ovocitos, una vez producida la ovulación (Austin, 1970), las cuales serían causantes de una menor penetrabilidad y/o incapacidad de desarrollo normal de los mismos.

Cabe recordar que, a pesar de los bajos porcentajes de fertilidad obtenidos, en un experimento en el cual la ovulación

se produjo en forma previa a las 12 hs post-hCG, pudiendo ser los ovocitos recuperados inmediatamente, se obtuvo un 60% de fertilización. Estos resultados podían estar indicando que la recuperación de los ovocitos en forma inmediata a su ovulación evitaría fenómenos de deterioro post-ovulatorio y permitiría la fertilización de los mismos. Sin embargo, estas condiciones no resultaron reproducibles debido a que, con excepción de un único caso, no fue posible encontrar nuevamente ovocitos en la ampulla en forma previa a las 12 hs post-hCG. A su vez, en este caso, tampoco fué posible obtener ovocitos fertilizados a pesar de haber sido los ovocitos recuperados en forma temprana. Tampoco fué posible obtener fertilización con ovocitos que fueron encontrados en la ampulla a las 12 hs post-hCG y recuperados inmediatamente para ser inseminados con espermatozoides ni al ser utilizados ovocitos recuperados directamente del ovario en forma previa a su ovulación. En conjunto, estos resultados podrían estar indicando que no serían fenómenos de deterioro post-ovulatorios los responsables de la falta de fertilización de ovocitos intactos.

Tal como ha sido mencionado en la Introducción, una de las consecuencias de la capacitación es la aparición de un tipo de motilidad característica (hiperactivación), la cual sería imprescindible para atravesar las envolturas que rodean al ovocito y, en particular, la zona pellucida (Katz and Yanagimachi, 1981; Yanagimachi, 1981). Un tipo de motilidad denominada "hiperactivada" ha sido descripta por Shalgi y Phillips en la rata (1988). Sin embargo, los movimientos del espermatozoide registrados por estos autores no serían tan característicos como los descriptos originalmente para el hamster

por Yanagimachi (1981), resultando sumamente difícil su observación sin la ayuda de equipos de videoanálisis. Si bien bajo nuestras condiciones experimentales se observaron modificaciones en el tipo de motilidad presentada por los espermatozoides a lo largo del período de incubación, no fué posible determinar inequívocamente si los movimientos observados se correspondían con el tipo de motilidad "hiperactivada" descrita para los espermatozoides de rata. Por lo tanto, una posible causa de la falta de fertilización de ovocitos con zona pellucida bajo estas condiciones experimentales podría ser la no ocurrencia de hiperactivación. Sin embargo, aún si éste fuera el caso, la falta de unión a la zona pellucida manifestada por los espermatozoides no sería consecuencia de problemas en la motilidad debido a que aún espermatozoides totalmente inmóviles son capaces de unirse a la zona pellucida (Saling, 1982).

Actualmente se están realizando estudios en el laboratorio tendientes a investigar las posibles causas de la no ocurrencia de la fertilización de ovocitos con zona pellucida *in vitro*.

Cabe destacar que, si bien hasta el momento no fué posible encontrar las condiciones adecuadas para la ocurrencia de la fertilización de ovocitos intactos *in vitro*, el desarrollo del ensayo de fusión a ovocitos sin zona pellucida resultó de fundamental importancia para la realización de este trabajo. Esto fue debido a que dicho ensayo no solamente fue utilizado como parámetro de la ocurrencia de la capacitación y reacción acrosomal, sino que permitió llevar a cabo los estudios correspondientes a la segunda parte de este trabajo en los cuales se investigó la función biológica de la proteína DE.

Una vez establecidas las condiciones experimentales que permitían la ocurrencia de la capacitación y reacción acrosomal *in vitro*, se procedió a capacitar espermatozoides provenientes del cauda epididimario con el fin de investigar el destino de la proteína DE durante el proceso de capacitación. Si bien los estudios de Kohane et al., (1980b), habían demostrado la existencia de una pérdida de DE durante incubaciones *in vitro*, los autores no corroboraron si las condiciones de incubación utilizadas permitían la ocurrencia de la capacitación. Por lo tanto, se propuso investigar si bajo las condiciones desarrolladas en este trabajo era posible corroborar la existencia de la pérdida mencionada. Con esta finalidad se evaluó mediante la técnica altamente sensible de ELISA, la proporción de DE remanente en los espermatozoides luego de un período de 5 hs de incubación bajo condiciones capacitantes. Los resultados demostraron la ocurrencia de una pérdida de alrededor del 60 % de proteína luego del proceso de capacitación. Estos resultados fueron similares a los valores presentados por Kohane (77% para espermatozoides incubados 5 hs bajo condiciones *in vitro*), pudiendo residir la pequeña diferencia hallada en las diferentes condiciones de incubación en cada caso.

El próximo paso consistió entonces en investigar si la disminución encontrada era producto de una pérdida completa de la proteína en cierto porcentaje de espermatozoides o alternativamente, de una pérdida sólo parcial de DE en los espermatozoides.

Con el fin de estudiar el porcentaje de espermatozoides que permanecía con la proteína asociada a la membrana al finalizar el

proceso de capacitación, se utilizó la técnica de IIF, debido a que la misma permitía analizar la presencia de DE sobre los espermatozoides en forma individual.

Los resultados indicaron que el número de espermatozoides capacitados que mostraban a la proteína DE en su superficie no difería del hallado entre los espermatozoides no capacitados. Por lo tanto, la pérdida encontrada no podía resultar una consecuencia de una disminución del número de células con DE en su superficie sino que, por el contrario, debía ser el resultado de una pérdida parcial de la proteína en cierto número de espermatozoides. Este número podría incluir a todos los espermatozoides, ó alternativamente la pérdida podría producirse solamente en cierta sub-población de células.

Sin embargo, al analizar la localización de la proteína DE entre los espermatozoides capacitados, se encontró que en un cierto porcentaje de los mismos ($\approx 51\%$), la marca fluorescente ya no se encontraba restringida a la región dorsal del acrosoma, sino que cubría la mayor parte de la cabeza. Estudiando en detalle la nueva localización se encontró que, de acuerdo al esquema ideado por Yanagimachi (1981) en base a los estudios realizados por Phillips (1977a), la nueva localización de DE coincidía con el dominio específico de la membrana plasmática correspondiente al segmento ecuatorial.

Dado que, a pesar de que los espermatozoides eran seleccionados por motilidad en forma previa a su capacitación, podía encontrarse cierta disminución del porcentaje de espermatozoides móviles durante la capacitación, se consideró la posibilidad de que esta nueva localización fuera una consecuencia de la pérdida de motilidad o deterioro que pudiera ocurrir durante la

incubación *in vitro*. Sin embargo, espermatozoides que habían sido mantenidos en PBS a temperatura ambiente durante 24 hs, encontrándose totalmente inmóviles y en su gran mayoría no viables, no presentaron esta nueva localización de la proteína. A su vez, fué posible encontrar espermatozoides capacitados, vivos y móviles con marcación fluorescente en el segmento ecuatorial, luego de haber sido sometidos a una IIF *in vivo*. En conjunto, estos resultados indicaban que este cambio en la localización de DE podía estar asociado a un fenómeno fisiológico. Esta posibilidad también se vió apoyada por los experimentos que demostraron que el porcentaje de espermatozoides con la nueva localización de DE aumentaba en función del tiempo de capacitación en forma paralela al porcentaje de penetración de ovocitos sin zona, es decir en forma paralela a la capacidad fertilizante expresada por dichos espermatozoides con la capacitación. Teniendo en cuenta que la capacitación y reacción acrosomal resultan imprescindibles para la fusión del espermatozoide con el ovocito, el aumento del porcentaje de células con redistribución en forma paralela al aumento de la capacidad de penetración de ovocitos podía estar indicando una posible vinculación entre la aparición de la proteína DE en el segmento ecuatorial y la ocurrencia de la capacitación y/o reacción acrosomal en los espermatozoides. Esta posibilidad se vió reforzada por la inhibición en el cambio de localización de DE observado entre espermatozoides incubados a 4°C, siendo ésta una condición bajo la cual no ocurre la capacitación.

El paso siguiente consistió en estudiar cuáles eran las posibles causas de la aparición de la nueva localización de la proteína DE. Existían tres posibilidades para la aparición de la

proteína DE en el segmento ecuatorial. Una explicación consistía en la posible existencia de una migración de moléculas desde la región dorsal de los espermatozoides hacia la región ecuatorial. Una segunda posibilidad consistía en que moléculas previamente localizadas en forma críptica en el segmento ecuatorial se expusieran durante la capacitación y, finalmente, una tercera alternativa consistía en que tanto la migración como la exposición de moléculas, se produjera en forma simultánea y que la aparición de DE con una nueva localización fuera un producto de ambos fenómenos.

Con el fin de estudiar la primera posibilidad, se realizaron experimentos en los cuales los espermatozoides eran incubados con anti-DE solamente al inicio de la capacitación, siendo posteriormente lavados del exceso de anticuerpo y capacitados *in vitro*, para ser finalmente analizado el porcentaje de células con redistribución de DE. Dado que estos espermatozoides no presentaron una disminución en el porcentaje de células con redistribución con respecto a los controles, los resultados indicaron la existencia de un fenómeno de migración de la proteína originalmente presente en la región dorsal.

A su vez, la no aparición de la nueva localización en espermatozoides no capacitados tratados con diversos agentes permeabilizantes, proteasas o alta fuerza iónica, así como la inhibición de la marcación en el segmento ecuatorial de espermatozoides cuya migración de DE resultó inhibida por acoplamiento del primer y segundo anticuerpo al inicio de la capacitación, permitieron descartar la posible existencia de un fenómeno de exposición de moléculas presentes en forma críptica en la región ecuatorial como única causa del cambio de localización de DE.

En esta última serie de experimentos, cuando los espermatozoides acoplados a ambos anticuerpos fueron capacitados y sometidos a la técnica de inmunofluorescencia, se observó un pequeño porcentaje ($\approx 15\%$) de espermatozoides con redistribución de DE. Dado que este porcentaje de células con redistribución sólo se encontraba al someter nuevamente a los espermatozoides capacitados (que ya habían sido incubados con el primer y segundo anticuerpo) a una nueva IIF, el porcentaje hallado podría deberse a un desprendimiento parcial del segundo anticuerpo en cierta subpoblación de espermatozoides, provocando con ello la deshinibición de la migración de moléculas de DE, que podrían desplazarse hacia el segmento ecuatorial. Una segunda alternativa, aunque menos probable consistiría en la existencia, en una subpoblación de espermatozoides, de cierta exposición de moléculas de DE no detectadas por los procedimientos permeabilizantes utilizados.

Resulta interesante recordar que, cuando espermatozoides no capacitados fueron sometidos a un proceso de inmunofluorescencia *in vivo* (sin previa fijación) y a 37°C , se encontraron células con agrupaciones ("patches") de marca fluorescente en la región dorsal, diferentes a la distribución uniforme de fluorescencia hallada en espermatozoides fijados en forma previa a su marcación. Teniendo en cuenta que generalmente los antígenos inducibles a formar "patches" por agregado de anticuerpos divalentes son considerados móviles en el plano de la membrana (Töpfer-Petersen et al., 1990a; Gaunt et al., 1983), la proteína DE podría constituir un ejemplo de este tipo de antígenos móviles. Con el fin de confirmar la hipótesis mencionada,

resultaría necesario medir la difusibilidad de la proteína en la membrana de los espermatozoides.

Además de la proteína DE y de la ya descrita PH-20 en el cobayo, existen otros ejemplos de redistribución de antígenos presentes en la membrana de espermatozoides de distintas especies, incluyendo al humano. Entre éstos se incluyen la enzima galactosiltransferasa de los espermatozoides de ratón (López & Shur, 1987), un antígeno presente en la región anterior del acrosoma de espermatozoides humanos (Villarroya & Scholler, 1987), el antígeno 2B1 presente en la cola de los espermatozoides de rata que migra a la región acrosomal (Jones et al., 1990), así como un antígeno que cambia su localización a la región anterior del acrosoma en el jabalí (Töpfer-Petersen et al., 1990b). Entre los mecanismos descritos hasta el momento para la migración de las proteína mencionadas, se incluyen la migración por difusión y posterior restricción (Jones et al., 1990; Villarroya & Scholler, 1987) y el transporte activo en contra de un gradiente de concentración (Cowan et al., 1991).

Tal como ha sido mencionado en la sección de Resultados, a pesar de producirse el desplazamiento de la proteína DE a partir de su localización original, la misma permanece restringida a un nuevo dominio de la membrana plasmática, y no se observa su posterior migración mas allá de este dominio aún luego de varias horas de incubación. Si bien se han propuesto diversas hipótesis (Eddy, 1988; Myles, 1987), actualmente no se encuentran establecidos los mecanismos causantes de la restricción de movilidad de componentes entre dominios. Las partículas intramembranas existentes en el segmento ecuatorial (Phillips,

1977a), podrían estar involucradas en una interacción con la proteína DE en el nuevo dominio, provocando la restricción de su movilidad. Cabe destacar que el hecho de que una proteína permanezca restringida a un dominio luego de su migración, no implica que la misma se encuentre inmobilizada en el nuevo dominio. Tal es el caso de la proteína PH-20 presente en la región postacrosomal del espermatozoide de cobayo, que migra hacia la membrana acrosomal interna (Myles et al., 1984). En este caso, tanto en forma previa como posterior a su migración, la proteína exhibe libre difusión en cada uno de estos dominios (Cowan et al., 1986).

Los experimentos descriptos indicaron que la aparición de espermatozoides con redistribución de DE durante la capacitación *in vitro*, se produce en forma paralela a la aparición de la capacidad de fusión con los ovocitos. Estos resultados podían estar indicando una asociación entre la migración de DE y la ocurrencia de la capacitación. Sin embargo, dado que la reacción acrosomal es un requisito indispensable para que se produzca la fusión con el oolema, la redistribución de la proteína podría vincularse con la ocurrencia de la reacción acrosomal en sí. Con el fin de estudiar esta última alternativa, se realizaron una serie de experimentos en los cuales se analizó el efecto de la ausencia de iones involucrados en la reacción acrosomal, como así también de agentes inductores de este proceso, sobre la ocurrencia de la redistribución de DE .

Los iones estudiados incluyeron al Ca^{2+} , imprescindible para la ocurrencia de la reacción acrosomal (Yanagimachi & Usui, 1974;

Green, 1978; Yanagimachi, 1982; Yanagimachi, 1988a) y al ión HCO_3^- que ha sido recientemente descrito como otro elemento involucrado en la ocurrencia de la reacción acrosomal (Lee & Storey, 1986). En ambos casos, los resultados indicaron que la falta de estos iones provocó una inhibición significativa del porcentaje de espermatozoides con redistribución.

En el caso de los experimentos sin calcio, de acuerdo a las mediciones realizadas por Yoshimatsu y Yanagimachi (1988) las trazas de calcio que pudieran permanecer en el medio debido a la no inclusión de un quelante específico para este ión serían insuficientes para permitir la ocurrencia de la reacción acrosomal. Por lo tanto, la disminución de la redistribución podía encontrarse vinculada con una inhibición de la reacción acrosomal.

En el caso de los experimentos sin HCO_3^- , los resultados demostraron que, si bien la ausencia de este ión provocaba una disminución significativa del porcentaje de espermatozoides con redistribución, un 35% de los espermatozoides incubados bajo estas condiciones mostraban aún a DE localizada en el segmento ecuatorial. Estos resultados podrían estar indicando que en el caso de los espermatozoides de rata, este ión podría favorecer la ocurrencia de la reacción acrosomal, sin resultar imprescindible para la misma. Esta situación coincidiría con la descrita por Bhattacharyya y Yanagimachi (1988) para la reacción acrosomal en el cobayo, ya que estos autores demostraron que la falta de HCO_3^- en el medio de capacitación provocaba una inhibición significativa pero no total de los porcentajes de espermatozoides reaccionados.

Existiría la posibilidad de que la disminución obtenida en los porcentajes de espermatozoides con redistribución resultara consecuencia de un efecto de estos iones sobre el proceso de capacitación. En este sentido, no existen trabajos previos que describan la posible influencia de los iones Ca^{2+} y HCO_3^- sobre este proceso en la rata. Si los resultados no hubieran revelado una disminución en la redistribución, la posible vinculación entre el cambio de localización de DE y la ocurrencia de la reacción acrosomal se habría descartado. Dado que los resultados obtenidos indicaron una inhibición de la migración, aún en caso de que esta inhibición fuera consecuencia de un efecto de los iones sobre la capacitación, la inhibición de la capacitación implicaría la no aparición de reacción acrosomal entre los espermatozoides y, por lo tanto, la menor redistribución podría estar reflejando esta menor aparición de espermatozoides reaccionados.

Fue utilizado entonces un inductor específico de la reacción acrosomal, como lo es el ionóforo de calcio A23187, el cual posee características de inductor universal ya que provoca la reacción acrosomal en los espermatozoides de todas las especies estudiadas hasta el momento (Talbot et al, 1976; Green, 1978; Watson & Plummer, 1986; White et al, 1990).

En una primera serie de experimentos se evaluó el efecto del ionóforo sobre espermatozoides previamente capacitados *in vitro*. Los resultados obtenidos indicaron que, como consecuencia del tratamiento con ionóforo, el porcentaje de espermatozoides con redistribución de DE aumentó significativamente en forma concentración-dependiente con respecto a los controles, pudiendo

ser encontrados porcentajes que superaron el 80% de espermatozoides con redistribución con la mayor concentración utilizada.

Cabe mencionar que, así como fué descripto para otras especies (Talbot et al., 1976; Watson & Plummer, 1986; Florman & First, 1988), el efecto inductor del ionóforo también pudo ser observado entre espermatozoides no capacitados. Sin embargo, si bien la estimulación provocada sobre los espermatozoides en forma previa a su capacitación resultaba proporcionalmente mayor que la obtenida entre los espermatozoides capacitados, el tratamiento con espermatozoides previamente capacitados por un período de 4 hs permitía obtener una población de espermatozoides con prácticamente la totalidad de los mismos presentando a la proteína DE en el segmento ecuatorial. Por lo tanto, fue éste el esquema experimental utilizado en los posteriores ensayos.

Dado que el agregado de ionóforo provocaba una inhibición inmediata de la motilidad de los espermatozoides, existía la posibilidad de que el mismo estuviera ejerciendo un efecto tóxico sobre las células. Sin embargo, cuando los espermatozoides fueron lavados y resuspendidos en medio capacitante conteniendo una alta concentración de BSA, procedimiento utilizado para la remoción del ionóforo libre (Thomas & Meizel, 1988; Suarez et al., 1987), los niveles de motilidad retornaron a valores similares a los controles. Bajo estas condiciones, los porcentajes de células con redistribución entre los espermatozoides reaccionados, se mantuvieron altos. Los resultados indicaron entonces que un inductor de la reacción acrosomal como el ionóforo de calcio A23187, provocaba la estimulación de la redistribución en espermatozoides que aún se

mantenían vivos luego de la inducción. Dado que fué posible demostrar que el efecto no se producía en un medio deficiente de calcio, la estimulación resultaba una consecuencia de la entrada de este ión al espermatozoide.

Un segundo procedimiento capaz de inducir la reacción acrosomal en los espermatozoides de rata, como lo es el tratamiento de los mismos con ciclos de congelamiento/descongelamiento sucesivos (Jones et al., 1990), también provocó un aumento del porcentaje de espermatozoides con redistribución. Por lo tanto, el hecho de que distintos tratamientos capaces de provocar la reacción acrosomal hayan demostrado poseer un efecto inductor sobre la redistribución de DE favorecería la hipótesis de una asociación entre la migración de DE y la ocurrencia del mencionado proceso exocitótico.

Finalmente, se creyó interesante investigar si un inductor fisiológico de la reacción acrosomal como lo es la zona pellucida homóloga, poseía también un efecto inductor sobre la redistribución de DE. Cabe destacar que hasta el momento no han aparecido estudios que demuestren el efecto de la zona pelucida sobre la reacción acrosomal en la rata, probablemente debido a la ya mencionada dificultad para evaluar este fenómeno bajo microscopía óptica. Sin embargo, en todas las especies en las cuales se ha ensayado su efecto hasta el momento, la misma provoca una inducción de la reacción acrosomal (ratón: Bleil & Wassarman, 1983; conejo: O'Rand & Fisher, 1987; bovino: Florman & First, 1988; humano: Cross et al., 1988), manifestándose este efecto inclusive en especies como el hamster, cuyos espermatozoides muestran un 100% de reacción acrosomal espontánea bajo condiciones capacitantes *in vitro* (Cherr et al., 1986, Uto

et al., 1988).

Fue necesario entonces desarrollar, en primer lugar, un sistema que permitiera la purificación en gran escala de zonas pellucidas de rata. La técnica finalmente utilizada se basó en aquella descrita por Oikawa y col (1988) para el hamster, la cual consistió en un sistema de filtración de tejido ovárico por mallas nytex con poros de tamaño decreciente. Este sistema permitió retener a las zonas pellucidas en la malla con el menor poro, filtrándose en cambio a través de la misma todo material particulado que no hubiera quedado retenido en las mallas de poro mayor.

Al ser estudiado el efecto de las zonas solubilizadas sobre los espermatozoides capacitados, los resultados indicaron que las mismas provocaron un aumento significativo en el porcentaje de células con redistribución. Si bien la estimulación observada (50.7% vs 30.5%) no fué tan pronunciada como en el caso de la inducción por ionóforo, los órdenes de estimulación fueron similares a los descriptos para las otras especies mencionadas utilizando concentraciones similares de zonas (bovino: 30% vs 11%, Florman & First, 1988; conejo: 30% vs 14%, O'Rand & Fisher, 1987; hamster: 35% vs 4%, Cherr et al., 1985).

Cabe mencionar que, tal como fué presentado en la sección Resultados, no fué posible encontrar un efecto de la inducción concentración-dependiente. Si bien esta misma situación ha sido encontrada en varias de las especies estudiadas (Cherr et al., 1986; O'Rand & Fisher, 1987), hasta el momento no es posible explicar este fenómeno. Una posibilidad sería la existencia de un efecto dependiente de la concentración sobre la velocidad inicial de ocurrencia de la reacción acrosomal y no sobre los valores

absolutos obtenidos al finalizar la incubación. Tal sería el caso de los espermatozoides bovinos según los estudios presentados por Florman y First (1988). Actualmente se están realizando experimentos tendientes a investigar el efecto obtenido con distintas concentraciones de zonas en tiempos cortos de incubación, con el fin de evaluar esta posibilidad.

En conjunto, los resultados indicados que demostraron un efecto estimulador de la redistribución por parte de distintos tratamientos inductores de la reacción acrosomal, constituyen una fuerte evidencia a favor de la asociación entre la migración de DE hacia el segmento ecuatorial y la ocurrencia de la reacción acrosomal bajo condiciones *in vitro*. Como se discutirá más adelante, esta posibilidad se vio mayormente reforzada por las observaciones realizadas sobre espermatozoides capacitados *in vivo*.

Resultaba interesante en este punto, estudiar si la proteína reconocida por anti-DE en el segmento ecuatorial de los espermatozoides reaccionados presentaba alguna modificación con respecto a aquella localizada en la región dorsal de los espermatozoides no capacitados. En esta serie de estudios se utilizaron espermatozoides tratados con ionóforo, con el fin de partir de una población de células que presentara a la proteína DE localizada en el segmento ecuatorial de la mayoría de los espermatozoides.

Los resultados confirmaron la identidad de la proteína localizada en el segmento ecuatorial con la proteína DE presente

en la región dorsal de los espermatozoides no capacitados. Esta situación resultó diferente que la descrita para el ya mencionado antígeno 2B1 presente en la cola de los espermatozoides de rata que migra a la región acrosomal, debido a que en este caso los autores demostraron la existencia de un cambio en el peso molecular del antígeno con la nueva localización (Jones et al, 1990). Teniendo en cuenta que en este caso, el cambio de localización no se produce como consecuencia de la reacción acrosomal, es probable que los mecanismos responsables de la migración de 2B1 sean diferentes a los involucrados en la migración de DE.

Con el objeto de investigar si el tratamiento de espermatozoides capacitados con ionóforo A23187 provocaba una pérdida adicional de proteína DE con respecto a la hallada entre los espermatozoides solamente capacitados, se procedió a analizar por medio de la técnica de ELISA la cantidad de proteína DE presente en los espermatozoides tratados con ionóforo luego de un proceso de capacitación.

Los resultados indicaron la existencia de una pérdida adicional de un 25% de la proteína con respecto a la encontrada previamente en los espermatozoides capacitados y no tratados con ionóforo. Teniendo en cuenta que el porcentaje de pérdida adicional se produjo solamente por la adición del ionóforo, es probable que la liberación de proteína de la superficie se encuentre directamente vinculada a la liberación del capuchón acrosomal con las moléculas de DE allí presentes. En este sentido, cabe recordar que los estudios de microscopía electrónica de Cameo y col (1986) demostraron la localización de moléculas de DE en las vesículas

formadas durante la reacción acrosomal.

Cabe mencionar que, teniendo en cuenta que como consecuencia de la reacción acrosomal se produce la exposición de la membrana acrosomal interna, conjuntamente con la aparición de continuidad entre la membrana plasmática y la acrosomal externa, existiría la posibilidad de que parte de la proteína sufriera un proceso de internalización hacia la membrana acrosomal externa, acrosomal interna, o al contenido acrosomal. En este caso, la pérdida detectada por la técnica de ELISA podría resultar parcialmente consecuencia de esta internalización. Sin embargo, si bien no se puede descartar la existencia de cierta internalización de la proteína, la liberación de DE desde la superficie de los espermatozoides hacia el medio de capacitación pudo ser verificada mediante la técnica de inmuno-electrotransferencia, ya que se encontró una gran cantidad de proteína DE en el medio de capacitación de los espermatozoides.

Resulta interesante mencionar el caso previamente descrito de la enzima galactosiltransferasa presente en espermatozoides de ratón. La misma se encuentra localizada en la región dorsal del acrosoma y cambia su localización al segmento ecuatorial en forma coincidente con la reacción acrosomal (López & Shur, 1987). Sin embargo, en éste caso, a diferencia de lo que ocurriría con la proteína DE, no pudo ser encontrada una pérdida de la enzima en los espermatozoides reaccionados. Estos resultados evidenciarían la ocurrencia de la migración de la enzima en forma previa al desprendimiento del capuchón.

Si bien los resultados presentados indican que cierta pérdida de DE se produciría como consecuencia del desprendimiento del capuchón acrosomal, no es posible descartar la posibilidad de que exista también una pérdida de la proteína durante la capacitación, en forma previa a la reacción acrosomal, retomando la hipótesis original que sugería una posible participación de DE como factor decapacitante. La posibilidad de una función decapacitante para las proteínas periféricas, incluyendo a la población de DE removible por fuerza iónica en los espermatozoides de rata, se vería favorecida por los experimentos que demuestran que el tratamiento de los espermatozoides con alta fuerza iónica en forma previa a la capacitación de los espermatozoides, provoca la aparición de un mayor porcentaje de células con redistribución de DE. Si, tal como se postula en este trabajo, la aparición de la proteína DE en el segmento ecuatorial se encontrara asociada con la ocurrencia de la reacción acrosomal, estos experimentos estarían indicando que la liberación de las proteínas periféricas favorecería la ocurrencia de la mencionada reacción.

Por un lado, se encuentra generalmente aceptado que las proteínas ó glicoproteínas liberadas durante la capacitación serían proteínas periféricas (Yanagimachi, 1988a). Por otro lado, ha sido descrito en numerosos casos la asociación entre la pérdida de proteínas periféricas y un aumento en la capacidad fertilizante (Oliphant & Brackett, 1973a; Fraser, 1984), y en la ocurrencia de la reacción acrosomal (Oliphant, 1976; Triana et al., 1980; Saling & Storey, 1979), considerándose entonces a las proteínas liberadas como factores decapacitantes.

En base a los resultados presentados, la proteína DE revestiría

características particulares debido a que, por un lado tendría similitudes con los denominados "factores decapacitantes", mientras que por otro lado, su permanencia en el segmento ecuatorial constituiría un indicio de funcionalidad en fenómenos de interacción de membranas. Cabe destacar que los estudios de Kohane y col (1980b) demostraron que el tratamiento de los espermatozoides frescos provenientes del cauda epididimario con fuerza iónica, provocaba una disminución de la proteína equivalente (de acuerdo a la extrapolación realizada a partir del gráfico presentado) a aquella encontrada como consecuencia de la incubación bajo condiciones capacitantes *in vitro*. Estos resultados sugerirían que sería la proteína periférica la liberada durante la capacitación.

Los estudios en los cuales el tratamiento de los espermatozoides con alta fuerza iónica en forma previa a la capacitación provocó la aparición de espermatozoides con redistribución durante su incubación bajo condiciones capacitantes *in vitro*, favorecerían la posibilidad de que la proteína DE no removible por alta fuerza iónica (y por ende, fuertemente asociada a la membrana) se encuentre involucrada en el fenómeno de migración. En este sentido, resulta interesante mencionar que todas las proteínas descritas hasta el momento en diversas especies como "migratorias" entre los dominios de membrana, poseen características de proteínas intrínsecas, ya sea por su naturaleza hidrofóbica, o por su unión covalente a componentes de membrana (Jones et al., 1990; Villarroya & Scholler, 1987; Töpfer-Petersen et al., 1990b; López & Shur, 1987, Phelps et al., 1988).

En conjunto, los resultados parecerían indicar que la proteína liberada sería la población "débilmente" unida a la membrana, y por ende removible por fuerza iónica, mientras que la proteína DE no removible por fuerza iónica ("fuertemente" unida) correspondería a aquella población involucrada en el proceso de migración.

Dado que los resultados presentados en este trabajo indican que la redistribución de DE se produciría en forma concomitante con la ocurrencia de la reacción acrosomal, la secuencia de eventos más probable y correspondiente con todas las evidencias presentadas sería la esquematizada en el modelo 1 de la Fig. V.1. Tal como se representa en el esquema mencionado, la proteína DE se localiza en la región dorsal de los espermatozoides que no han iniciado la reacción acrosomal (1a). Una vez desencadenada la entrada de calcio que marca el inicio de la reacción acrosomal, y en forma concomitante con la aparición de puntos de fusión entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa, se produciría la migración de cierta población de moléculas de DE hacia el segmento ecuatorial (1b). Posteriormente, el capuchón acrosomal se vesiculizaría (1c) para ser finalmente liberado conteniendo a las moléculas de DE que no hubieran participado de la migración, y permaneciendo localizada en el segmento ecuatorial la población de DE remanente (1d). Por otro lado, se descartaría la posibilidad de que la migración de DE previa a la vesiculización involucrara a todas las moléculas de proteína localizadas originalmente en la región dorsal (modelo 2), debido a que, tal como ha sido mencionado, estudios previos de microscopía electrónica (Cameo et al., 1986) revelaron la presencia de moléculas de DE en las vesículas acrosomales. Si la

Fig.V.1. Modelos explicativos de la relación temporal entre la migración de DE y la vesiculización del capuchón acrosomal

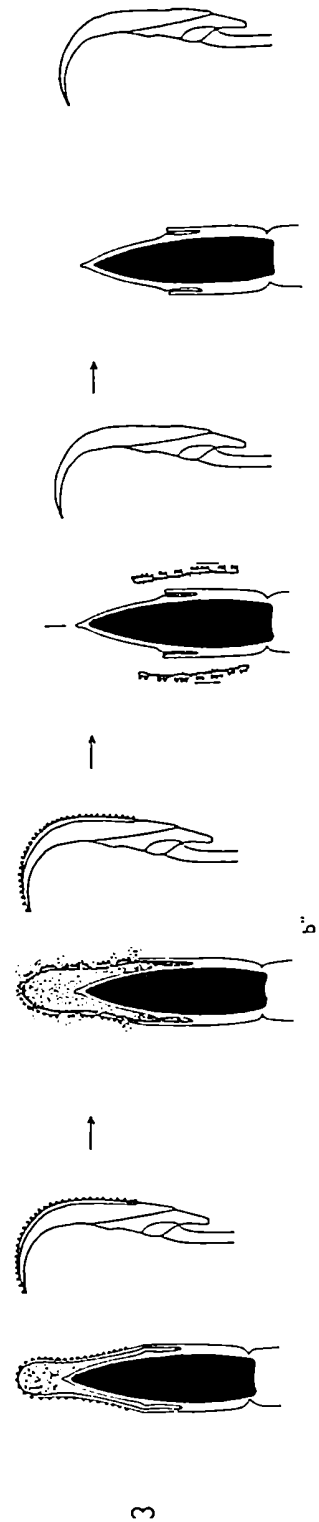
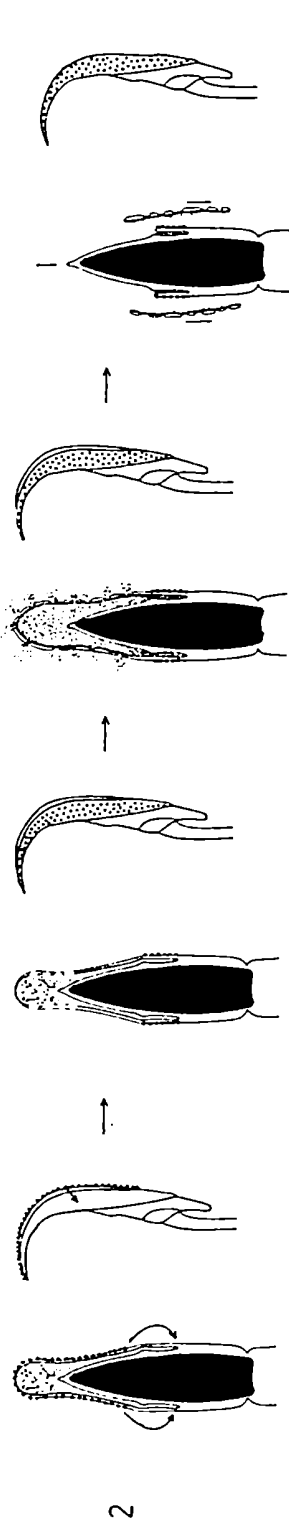
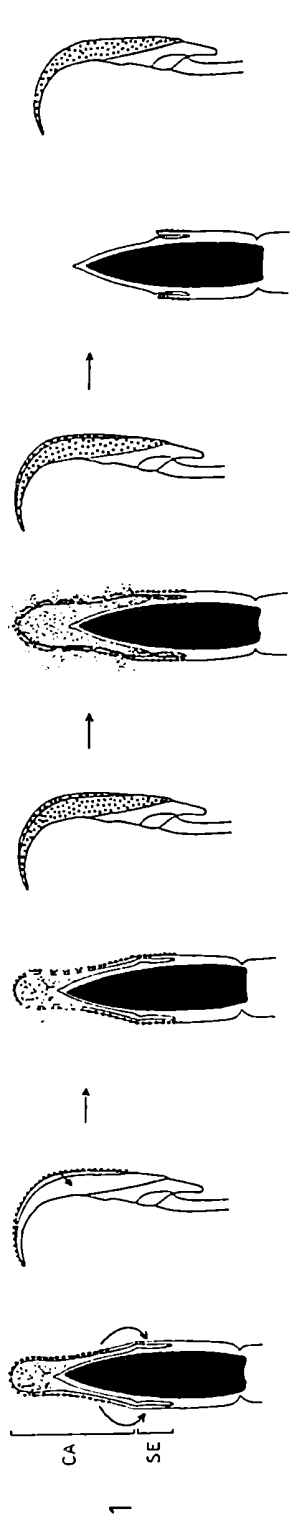
En cada cuadro: a la izquierda se esquematiza un corte sagital de la cabeza del espermatozoide, a la derecha se representa una vista lateral de la cabeza del espermatozoide. (CA) capuchón acrosomal, (SE) segmento ecuatorial.

Modelo 1: (a) localización dorsal de la proteína DE, (b) migración de parte de las moléculas de DE hacia el segmento ecuatorial, en forma concomitante con la aparición de puntos de fusión entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa, (c) vesiculización del acrosoma con liberación de moléculas de DE allí contenidas, (d) desprendimiento del capuchón acrosomal, localización de DE en el segmento ecuatorial.

Modelo 2: (a') localización dorsal de DE, (b') migración completa de DE hacia el segmento ecuatorial, (c') vesiculización del acrosoma, ausencia de DE en las vesículas, (d') desprendimiento de las vesículas sin moléculas de DE en las mismas, localización de DE en el segmento ecuatorial.

Modelo 3: (a'') localización dorsal de la proteína DE, (b'') vesiculización del acrosoma en forma previa a la migración de DE, (c'') desprendimiento del capuchón acrosomal con las moléculas de DE allí contenidas, (d'') ausencia de DE en el espermatozoide que ha completado la reacción acrosomal.

(●)Proteína DE



migración de DE fuera completa (2b'), no sería posible visualizar a esta proteína en las vesículas (2c'), a pesar de poder localizarse en el segmento ecuatorial de los espermatozoides reaccionados (2d'), Finalmente, tampoco sería posible que la vesiculización se produjera en forma previa a la migración (modelo 3, b"), debido a que el desprendimiento de las vesículas implicaría la pérdida de toda la proteína allí localizada (3 c"), no pudiendo la proteína ser finalmente localizada en el segmento ecuatorial (3d").

Cabe mencionar que, si bien en forma poco probable, podría suceder que la localización original de DE en los espermatozoides no capacitados incluyera una región del segmento ecuatorial que no se desprendiera durante la reacción acrosomal, pudiendo las moléculas de DE allí localizadas participar de la migración luego de producida la liberación del capuchón. Sin embargo, esta alternativa implicaría la ocurrencia de una redistribución de una proteína en un mismo dominio de la membrana, fenómeno que hasta el momento no ha sido descrito para ninguno de los antígenos estudiados.

Una vez establecida la ocurrencia de la redistribución de DE y su posible asociación con la reacción acrosomal bajo condiciones *in vitro*, se propuso investigar si este mismo fenómeno se manifestaba bajo condiciones capacitantes *in vivo*.

Los resultados confirmaron nuevamente la permanencia de la proteína, inclusive en espermatozoides asociados al cumulus oophorus. Al ser analizado el porcentaje de células con redistribución de DE entre los espermatozoides recuperados del oviducto luego de 6 hs de incubación *in vivo*, se encontró un 15%

y 21% entre los espermatozoides presentes en forma libre en el oviducto o asociados al cumulus oophorus, respectivamente. Si la redistribución se encontrara asociada a la ocurrencia de la reacción acrosomal, los porcentajes de células con redistribución encontrados corresponderían a porcentajes de espermatozoides reaccionados, y serían consistentes con los hallados entre espermatozoides presentes en el oviducto de otras especies (Yanagimachi & Phillips, 1984; Suarez, 1983). Por lo tanto, los porcentajes de espermatozoides encontrados resultarían una evidencia más a favor de la postulada vinculación entre la migración de DE al segmento ecuatorial y la ocurrencia de la reacción acrosomal. Por otro lado, dado que sólo los espermatozoides capacitados son capaces de penetrar el cumulus oophorus (Austin, 1960; Yanagimachi, 1988a), si la redistribución ocurriera como consecuencia de este proceso, debería encontrarse un 100% de espermatozoides con redistribución entre aquellos asociados a las células del cumulus oophorus. Teniendo en cuenta que sólo se encontró un 21%, estos resultados constituirían una nueva evidencia a favor de la asociación entre la migración de DE y la reacción acrosomal.

Entre los resultados que más fuertemente confirman la hipótesis de la vinculación entre la redistribución de DE y la reacción acrosomal se encuentran aquellos en los cuales se demostró la localización de DE en el segmento ecuatorial de los espermatozoides perivitelinos. Teniendo en cuenta que solamente los espermatozoides que han sufrido la reacción acrosomal son capaces de atravesar la zona pellucida, las observaciones halladas indican la ocurrencia de un 100% de redistribución en espermatozoides necesariamente reaccionados.

Por lo tanto, en conjunto, esta serie de experimentos permitió evidenciar que también bajo condiciones capacitantes *in vivo* la proteína DE presente en los espermatozoides se redistribuye al segmento ecuatorial. A su vez, las observaciones realizadas bajo condiciones *in vivo*, apoyarían fuertemente la existencia de una asociación entre la migración de DE y la ocurrencia de la reacción acrosomal.

Teniendo en cuenta que las evidencias aquí presentadas, tanto *in vitro* como *in vivo*, indican que la redistribución de DE se encontraría asociada específicamente a la ocurrencia de la reacción acrosomal, la técnica de inmunofluorescencia utilizando al anticuerpo anti-DE podría constituir una herramienta muy útil para la evaluación de este proceso en la rata. Actualmente se han iniciado una serie de estudios de microscopía electrónica con el fin de confirmar esta posibilidad.

Resulta importante destacar que, tal como se mencionara anteriormente, si bien se han descrito distintos casos de migración de proteínas durante la capacitación y/o reacción acrosomal en diversas especies, incluyendo al hombre (Myles, 1984; Villarroya & Scholler, 1987; López & Shur, 1987; Töpfer-Petersen et al., 1990b; Jones et al., 1990), los resultados que aquí se presentan constituyen la primera evidencia de la redistribución de una proteína de origen epididimario. A su vez, mientras que todos los estudios mencionados fueron realizados bajo condiciones *in vitro*, este es el primer caso en el cual se demuestra la ocurrencia de un fenómeno de redistribución bajo condiciones capacitantes *in vivo*, e inclusive en asociación con el ovocito y sus envolturas.

Dado que, como ha sido mencionado al inicio de este trabajo, existía la posibilidad de que la proteína DE tuviera una posible función en el proceso de fertilización en sí, se inició una segunda serie de estudios (Segunda Parte) destinados a investigar la función biológica de esta proteína en el citado proceso.

Los resultados descritos en la Primera Parte demostraron la existencia de un fenómeno de migración de DE al segmento ecuatorial del espermatozoide, asociado con la ocurrencia de la reacción acrosomal. Por un lado, y tal como se ha mencionado en la Introducción, la reacción acrosomal es un evento imprescindible para que el espermatozoide se fusione con el ovocito. Por otro lado, el segmento ecuatorial constituye la región por la cual se produce la fusión con el oolema. En base a estas observaciones se propuso investigar la posible participación, de la proteína DE en el evento específico de fusión entre las gametas.

Debido a que las etapas previas a la fusión con el oolema (interacción y penetración de la zona pellucida) poseen requerimientos propios y diferentes de la fusión en sí, los cuales podrían impedir la evaluación correcta de los resultados obtenidos, el ensayo de penetración a ovocitos sin zona pellucida resultó ser un diseño experimental adecuado para estudiar la participación de la proteína en este proceso. Cabe destacar que los estudios del proceso de fusión *in vitro* son realizados con

ovocitos liberados de la zona pellucida, y por lo tanto con el oolema expuesto, aún en especies en las cuales es posible obtener en forma reproducible un 100% de fertilización de ovocitos intactos *in vitro* (Yanagimachi, 1988b).

Uno de los sistemas corrientemente utilizados para la obtención de ovocitos sin zona pellucida en diferentes especies consiste en el tratamiento de los ovocitos con enzimas proteolíticas como la tripsina, pronasa y quimotripsina (Boldt & Wolf, 1986). Sin embargo, si bien este tratamiento no afecta la penetrabilidad de los ovocitos sin zona pellucida de hamster (Hirao & Yanagimachi, 1978b), la utilización de enzimas como la quimotripsina ó pronasa para remover la zona de los ovocitos de ratón provoca una disminución en su penetración posterior (Wolf et al., 1976). Por lo tanto, el sistema utilizado para la obtención de ovocitos sin zona pellucida de rata consistió en un tratamiento con pH ácido, debido a que el mismo no altera la penetrabilidad de los ovocitos.

Con el fin de estudiar la posible participación de la proteína DE en el proceso de fusión, se evaluó el efecto del anticuerpo anti-DE sobre la penetración de ovocitos sin zona pellucida. Al ser realizados los experimentos en condiciones de penetración monospermicas, los resultados indicaron una inhibición prácticamente total ($\approx 90\%$) del porcentaje de penetración, la cual no fué debida a un efecto sobre la motilidad de los espermatozoides o sobre la viabilidad de los ovocitos en sí. A su vez, tal como fuera descripto en la Primera Parte (Sección III.3.), la incubación de los espermatozoides en forma previa a la capacitación con una concentración de anti-DE capaz de ejercer un efecto inhibitorio de la fusión, no provocó una alteración de

la ocurrencia de la redistribución, lo cual significaría que no alteró la ocurrencia de la reacción acrosomal. Estos últimos resultados indicarían que la presencia del anticuerpo no habría provocado alteraciones a nivel de la membrana del espermatozoide.

Al ser utilizadas las mismas concentraciones de anticuerpo con una concentración de espermatozoides suficientemente alta como para provocar un 100% de penetración polispérmica, si bien no se obtuvo una inhibición del número de ovocitos penetrados, se encontró una disminución significativa en el número de espermatozoides presentes en el ooplasma de cada ovocito.

El paso siguiente consistió en estudiar más profundamente el evento específico del proceso de fusión que se encontraba interferido por el anticuerpo anti-DE. Tal como se ha mencionado en la Introducción, el proceso de fusión consta de dos etapas: una primera etapa de unión de los espermatozoides al oolema, imprescindible para la ocurrencia de una segunda etapa de fusión de las membranas en sí. Se propuso investigar si la participación de DE ocurría desde la primera etapa de unión.

En primer lugar se investigaron las características de la etapa de unión de los espermatozoides de rata a la membrana plasmática de los ovocitos. Esta etapa, al igual que la fusión, demostró ser dependiente de la capacitación. A su vez, su aparición en el tiempo coincidió con la aparición de la capacidad de fusión, sugiriendo estos resultados la naturaleza fisiológica de esta etapa. La dependencia de la capacitación para expresar la capacidad de unión al oolema también fué demostrado por Liu y col (1990) para espermatozoides y ovocitos humanos y por Wolf y Hamada (1979) para el ratón. Cabe destacar que en este último

trabajo, los espermatozoides no capacitados manifestaron cierta capacidad de unión al oolema, aunque mucho menor que en el caso de aquellos que habían sufrido el proceso de capacitación. Tanto en los experimentos en la rata aquí presentados como en los experimentos de ovocitos humanos (Liu et al., 1990), la extracción de la zona pellucida se realizó con tratamiento ácido. Teniendo en cuenta que en el caso del trabajo de Wolf y Hamada en el ratón se utilizó un tratamiento enzimático, es probable que la existencia de cierto grado de unión por parte de los espermatozoides no capacitados indicada por estos autores, fuera debida a posibles alteraciones de la membrana plasmática como consecuencia de dicho tratamiento.

Con el fin de investigar la posible participación de DE en la etapa de unión de los espermatozoides a la membrana plasmática del ovocito, se evaluó el efecto del anticuerpo anti-DE sobre el porcentaje de ovocitos con espermatozoides unidos.

Los experimentos indicaron un efecto inhibitorio de anti-DE sobre la unión de los espermatozoides preincubados con el anticuerpo al oolema.

La utilización tanto de anticuerpos policlonales (Tzartos, 1979) como monoclonales (Saling et al., 1985; Primakoff et al., 1987; Okabe et al., 1988, 1990) dirigidos contra proteínas totales del espermatozoide, permitió demostrar la participación de proteínas del espermatozoide en el proceso de fusión. Entre los estudios mencionados, se encuentran casos de inhibición por efecto de los anticuerpos sobre la unión de los espermatozoides al oolema (Okabe et al., 1988, 1990) mientras que otros demostraron interferir con el proceso de fusión en sí (Primakoff

et al., 1987; Saling et al., 1985). En conjunto, estos trabajos estarían indicando la mediación de proteínas de membrana del espermatozoide en ambos eventos. En el caso de los antígenos estudiados por Saling (1985) y Okabe (1988, 1990), su localización se encontró restringida al segmento ecuatorial de espermatozoides reaccionados pero no así de los intactos, pudiendo poseer una localización original en la membrana acrosomal externa o en la plasmática en forma críptica. Cabe destacar que todos los estudios mencionados fueron realizados con anticuerpos dirigidos contra preparaciones de proteínas totales del espermatozoide. Exceptuando a la proteína PH-30 en el cobayo que fue posteriormente purificada (Primakoff, et al., 1987), en el resto de los casos sólo se realizó una identificación preliminar de los componentes involucrados.

La existencia de una etapa previa de íntima unión entre las membranas que posteriormente se fusionarán entre sí, ha sido demostrada en diversos sistemas celulares (Burger & Verkleij, 1990). La misma sería necesaria para destruir las fuerzas repulsivas generadas entre las bicapas lipídicas interactuantes (Lucy & Ahkong, 1986). Esta etapa ha demostrado ser un componente esencial de las respuestas fusogénicas de diversos modelos celulares. Teniendo en cuenta la gran variedad y especificidad de los eventos de fusión de membranas biológicas, resulta predecible la existencia de mecanismos de reconocimiento específicos (Burger & Verkleij, 1990), sin embargo, hasta el momento, son pocos los componentes identificados con una función específica en este proceso. Los estudios existentes involucran a componentes de naturaleza proteica o glicoproteica, entre los cuales se encuentran glicoproteínas de origen viral, necesarias para la

unión y fusión con la célula huésped (White, 1983); proteínas bacterianas requeridas para la adherencia a células epiteliales (Brett Finlay et al., 1989) o glicoproteínas involucradas en la unión de mioblastos durante la diferenciación de las células musculares (Knudsen, 1985). En el caso particular de la fusión espermatozoide-ovocito, ha sido posible identificar una proteína presente en espermatozoides de erizo de mar ("bindina"), la cual participaría tanto en la interacción de los espermatozoides con las envolturas del ovocito, como en la fusión entre las gametas (Glabe, 1985). Esto último fué sugerido en base a experimentos que demostraron la existencia de una agregación de vesículas compuestas por fosfolípidos en presencia de la proteína purificada (Glabe, 1985). Sin embargo, los mismos resultados no fueron corroborados para el proceso de fusión de las gametas.

Los resultados descriptos permitieron evidenciar una posible función de la proteína DE en el proceso de fusión del espermatozoide con el ovocito. En caso de encontrarse la proteína DE involucrada en este proceso a través de una posible interacción con componentes en el oolema, la adición de proteína purificada a los ovocitos, en forma previa a su inseminación, debía inhibir competitivamente el proceso de fusión entre las gametas. Con el fin de investigar esta posibilidad, se ensayó el efecto de la incubación de ovocitos sin zona pellucida con una alta concentración de proteína DE, sobre su posterior penetración por espermatozoides capacitados.

Los resultados indicaron que el agregado de la proteína provocó una inhibición prácticamente total (\approx 90%) del porcentaje de

ovocitos penetrados. Esta inhibición resultó ser específica, ya que no fue provocada por otras proteínas y glicoproteínas utilizadas como control. Cabe destacar que entre las proteínas utilizadas como control se incluyó a la ovoalbúmina, la cual demostró inhibir la fertilización de ovocitos de hamster al encontrarse presente durante la interacción de las gametas (Ahuja, 1982).

Con el fin de descartar la posibilidad de que la inhibición observada fuera debida a la existencia de un efecto tóxico de la proteína o a una posible internalización de la misma, los ovocitos preincubados con DE fueron lavados e inseminados posteriormente con espermatozoides capacitados. Los resultados demostraron que el lavado de los mismos retornaba a los ovocitos su penetrabilidad, descartándose entonces las alternativas mencionadas anteriormente. Por lo tanto, la falta de penetración observada al ser los ovocitos preincubados con DE, era probablemente una consecuencia de la interferencia de la proteína con alguno de los eventos comprendidos en el proceso de fusión. A su vez, estos resultados estaban indicando la posible presencia de sitios de interacción para la proteína DE en el oolema, con los cuales la proteína solubilizada podía haber interactuado, al ser agregada a los ovocitos en forma previa a su inseminación.

Curiosamente, a diferencia de los experimentos de inhibición de fusión por agregado de anticuerpo, los ovocitos preincubados con DE que no habían sido penetrados, presentaban espermatozoides unidos a su superficie al finalizar la incubación. Con el fin de determinar precisamente cuál era la capacidad de unión de los espermatozoides a la membrana de ovocitos preincubados con DE, se realizó el ensayo de unión al oolema en presencia de esta

proteína.

Los resultados indicaron que los porcentajes e índices de unión hallados entre los ovocitos preincubados con DE, con otra proteína control o, en medio RFM sin agregados, no resultaron significativamente diferentes entre sí. Por lo tanto, existía la posibilidad de que la presencia de la proteína DE durante la coincubación de las gametas, estuviera provocando una inhibición de un evento posterior a la unión primera de los espermatozoides al oolema.

Por otro lado, cuando los ovocitos preincubados con DE que presentaban espermatozoides asociados, fueron lavados y transferidos a una gota libre de proteína (y de espermatozoides), se observó la posterior penetración de los mismos por dichos espermatozoides. Estos resultados favorecían la posibilidad de que la proteína presente durante la coincubación de las gametas estuviera interfiriendo con la ocurrencia de eventos consecutivos a la unión de los espermatozoides a la membrana plasmática del ovocito. A su vez estos resultados confirmaron la naturaleza fisiológica de la unión de los espermatozoides observada.

Si la proteína agregada a los ovocitos hubiera estado interfiriendo con eventos posteriores a la unión primera al oolema, una posible explicación en base a estas observaciones consistiría en la coexistencia de dos funciones en la misma proteína: una función en la unión primera de los espermatozoides al oolema y una segunda función en alguno de los eventos posteriores a esta unión y conducentes a la fusión en sí. De ser así existirían sitios de interacción diferentes involucrados en cada una de las funciones, que podrían interactuar entre sí, al

unirse una misma molécula de DE a ambos tipos de sitios. En la Fig. V.2 (secuencia 1) se esquematiza la hipótesis mencionada. Tal como se presenta en el esquema de la Fig. V.2, la proteína DE interactuaría con un primer tipo de sitio en el oolema, permitiendo la unión de los espermatozoides (1a-b). Una vez producida esta primera unión, la proteína podría sufrir un cambio conformacional que permitiera su interacción con un segundo sitio (1c), y una vez unida a ambos facilitaría la interacción entre los dos sitios presentes en el oolema, la cual sería necesaria para la prosecución de los eventos posteriores (1d).

En este punto resulta relevante mencionar el mecanismo de entrada de ciertos virus a células, para los cuales también resulta necesaria la ocurrencia de una etapa previa de unión de los virus a la membrana de la célula huésped para que se produzca posteriormente la fusión (White, 1983; Hoekstra, 1990). En el caso de ciertos virus, se han descrito proteínas virales que contienen tanto la actividad de unión a la membrana de la célula huésped como la de fusión, en distintos sitios de una misma proteína (Hoekstra, 1990). Tal sería la situación de la glicoproteína HA del virus de la influenza, la cual posee tanto la actividad de unión como la de fusión en sí (White, 1983). En este caso, la proteína interactúa con residuos de ácido siálico presentes en la membrana de la célula huésped, y a través de esta interacción se produce la unión del virus. Una vez unida a la membrana de la célula huésped, la proteína HA sufre un cambio conformacional pH-dependiente, exponiéndose una región hidrofóbica que interactuaría con componentes de la membrana del huésped, determinando el desencadenamiento de la fusión (Hoekstra, 1990). Otro ejemplo de una proteína involucrada en un

proceso de fusión entre células conteniendo ambas actividades (unión y fusión) en la misma molécula lo constituye el receptor CD4, presente en macrófagos y linfocitos, para la glicoproteína gp120 del virus HIV (Sattentau & Weiss, 1988). En este caso, mediante la utilización de anticuerpos monoclonales dirigidos contra distintos epitopes de la misma proteína fué posible inhibir alternativamente la actividad de unión o fusión en sí, revelando estos estudios la coexistencia de las dos funciones en la misma proteína (Healey et al., 1990).

El hecho de no haber encontrado una inhibición de la unión de los espermatozoides en presencia de la proteína DE solubilizada durante el ensayo de fusión, podría tener dos posibles explicaciones. Una de ellas, esquematizada en la Figura V.2. (secuencia 2), sería que los componentes del oolema involucrados en la etapa de unión, si bien interactuaran con la proteína DE presente en los espermatozoides, no fueran "saturables" o "enmascarables" por la presencia de proteína solubilizada (2a'-b'), siendo en cambio, los sitios involucrados en los eventos posteriores a la unión, los que se encontrarían interferidos o saturados por la presencia de DE (2b'). En este caso, los espermatozoides podrían unirse al primer sitio (2c'), pero no se podría producir la interacción necesaria entre los dos sitios de unión (2d').

Una segunda y más probable explicación se basa en los estudios ya descritos de Wong y Tsang (1982) que indicarían la presencia de receptores para DE en la membrana plasmática del espermatozoide. Estos autores demostraron que aún los espermatozoides completamente maduros eran capaces de unir una

proteína de 32 K similar a DE, a través de los receptores descritos (Wong & Tsang, 1982). Si éste fuera el caso, al encontrarse los espermatozoides con los ovocitos cubiertos de proteína DE solubilizada, se unirían a la misma a través de sus receptores libres.

Esta segunda posibilidad se esquematiza en la secuencia 3 de la Fig. V.2. Si el cambio conformacional de la proteína DE, necesario para la interacción de una misma molécula de DE con ambos tipos de sitios en el oolema, sólo pudiera producirse al encontrarse la proteína asociada a la membrana de los espermatozoides, al ser agregada la misma en forma solubilizada, distintas moléculas se unirían a los distintos sitios (3a"). En este caso, aún pudiendo los espermatozoides unirse posteriormente al ovocito a través de sus receptores libres para DE (3b"), no se podría producir la interacción necesaria de los dos tipos de sitios en el oolema para el desencadenamiento de la fusión (3c"). La posibilidad de que únicamente la proteína asociada a la membrana de los espermatozoides pudiera interactuar con los dos tipos de sitios en forma simultánea sería una situación similar a la descrita para la ya mencionada proteína HA del virus de la influenza. En este caso, solamente la proteína anclada a la membrana de los virus puede participar de la primera etapa de unión y posteriormente sufrir el cambio conformacional necesario para participar del posterior evento de fusión (White et al., 1983).

Los estudios llevados a cabo hasta el momento no permiten discriminar entre las posibles alternativas mencionadas, y por lo tanto se prevee la iniciación de nuevos estudios tendientes a

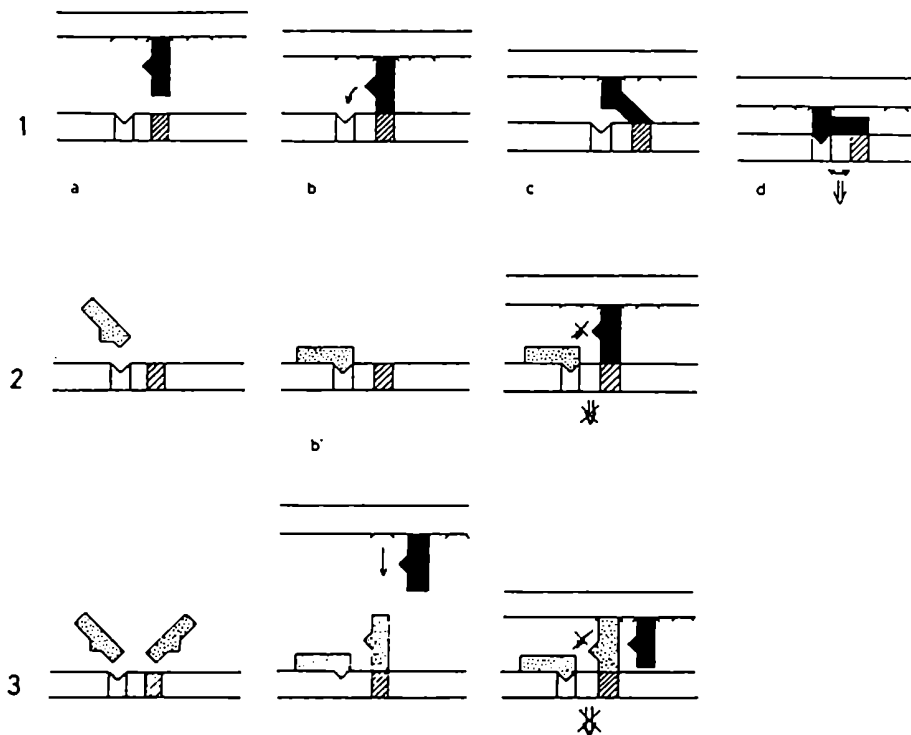
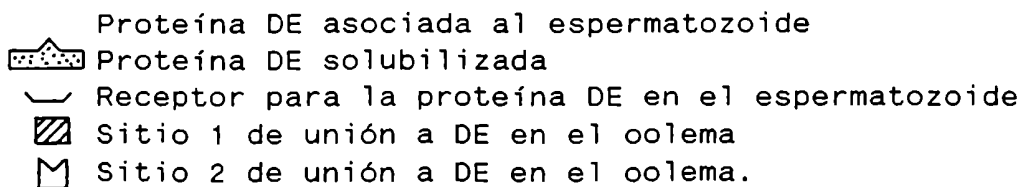


Fig V.2. Posible modelo de la participación de la proteína DE en el proceso de fusión del espermatozoide con el ovocito.

Secuencia 1: (a) proteína DE asociada a receptores presentes en la membrana del espermatozoide, presencia de dos tipos de sitios de unión (1 y 2) para DE en el oolema, (b) interacción de la proteína DE presente en la membrana del espermatozoide con el sitio de unión 1 en el oolema, (c) ocurrencia de un cambio conformacional de la proteína DE, necesario para la posterior unión al sitio 2, (d) interacción entre los sitios de unión para DE (1 y 2) y activación de eventos consecutivos del proceso de fusión. Secuencia 2: (a') agregado de proteína DE solubilizada, (b') saturación del sitio 2 por interacción con la proteína solubilizada, (c') unión de la proteína DE presente en la membrana del espermatozoide al sitio 1, inhibición de la unión de DE al sitio 2 y, por ende, de la interacción de los sitios de unión entre sí no permitiendo la ocurrencia de la fusión. Secuencia 3: (a'') agregado de proteína solubilizada, (b'') saturación de los sitios 1 y 2 por diferentes moléculas de DE, (c'') unión de los espermatozoides a la proteína DE presente en el oolema a través de receptores para DE libres en la membrana del espermatozoide, inhibición de la interacción entre los sitios 1 y 2 al encontrarse unidos a diferentes moléculas de DE e inhibición de la fusión.



investigar más profundamente la interacción de la proteína DE con los componentes de membrana del espermatozoide y el ovocito. Cabe mencionar, que el modelo propuesto en base a los resultados hallados constituye sólo una de las posibles alternativas para la participación de DE en el proceso de fusión. Entre otras, no se descarta la posible existencia de fenómenos de íntima cooperación de la proteína DE con otras moléculas presentes en la membrana del espermatozoide que también se encuentren involucradas en el proceso de fusión con el ovocito, pudiendo deberse los efectos encontrados a inhibiciones o alteraciones de esta posible interacción.

Tal como ha sido mencionado en la Introducción, es imprescindible la ocurrencia de la reacción acrosomal para que el espermatozoide pueda fertilizar al ovocito. Esto es debido a las dos funciones que posee la reacción acrosomal ya que, en primer lugar, permite que los espermatozoides sean capaces de atravesar la zona pellucida y, en segundo lugar, desencadena un cambio fisiológico a nivel del segmento ecuatorial que otorga a la membrana plasmática del espermatozoide la capacidad de fusión con el oolema. Cabe destacar que hasta el momento son desconocidos los mecanismos que permiten al segmento ecuatorial de los espermatozoides adquirir fusogenicidad y participar en la fusión con la membrana plasmática del ovocito durante el proceso de fertilización (Yanagimachi, 1988b).

Por un lado, tal como ha sido presentado, la proteína DE migra al segmento ecuatorial de los espermatozoides, muy probablemente en forma concomitante con la ocurrencia de la reacción acrosomal. Por otro lado, los experimentos presentados en este trabajo indicarían la participación de DE en el proceso de fusión con el

ovocito. Una posible secuencia de eventos podría ser la siguiente:

Como consecuencia de la reacción acrosomal se produce la migración de la proteína DE al segmento ecuatorial. Dado que esta proteína poseería funciones específicas en la interacción con el oolema, siendo esta interacción imprescindible para la ocurrencia posterior de la fusión entre las gametas, el dominio en el cual se encuentra localizada la proteína DE (segmento ecuatorial) sería el que finalmente participaría de la fusión con el ovocito.

Esta secuencia de eventos constituiría una explicación atractiva para la adquisición de fusogenicidad por parte del segmento ecuatorial, evento cuyas causas son desconocidas hasta el momento. Por lo tanto, en base a los resultados mencionados, la migración y/o exposición de moléculas involucradas en la interacción con el oolema hacia el segmento ecuatorial, podría ser un mecanismo responsable de la adquisición de fusogenicidad por parte de este dominio específico de la membrana del espermatozoide.

Tal como se mencionara, los resultados presentados no solamente evidenciaban la participación de la proteína DE en el proceso de fusión, sino que a su vez, sugerían la posible existencia de sitios de interacción para la proteína DE en la membrana del ovocito. Por lo tanto, se propuso realizar una serie de experimentos con el fin de examinar la presencia y localización de estos sitios en el oolema. Para ello se procedió a incubar ovocitos con la proteína DE, para ser posteriormente fijados y sometidos a la técnica de IIF utilizando a anti-DE como primer anticuerpo ó IgG de conejo normal como control. Un segundo

control lo constituyeron ovocitos preincubados con la glicoproteína ovoalbúmina ó con fibronectina, utilizando en este último caso el anticuerpo anti-fibronectina en la IIF.

Los resultados revelaron, en el caso de los ovocitos preincubados con DE y tratados con anti-DE, la presencia de áreas discretas de marca fluorescente, localizadas en la periferia del ovocito. Resultó remarcable el hecho de que la fluorescencia no se encontrara homogéneamente distribuida, sino que se presentara en forma de agregados ("patches"). Cuando los ovocitos fueron incubados con la proteína DE a 4°C, la marcación apareció con una distribución más uniforme. Esta dependencia de la temperatura del patrón de marcación obtenido, indicó la posible existencia de un fenómeno de agregación de componentes presentes en el oolema, probablemente provocado por su interacción con la proteína DE a una temperatura permisiva para la agregación. Estos resultados serían similares a los obtenidos por Nicolson y col (1975) al emplear lectinas conjugadas con ferritina con la finalidad de localizar sitios de unión a las mismas en el oolema. En el trabajo mencionado, cuando los ovocitos eran incubados con las lectinas a una temperatura de 25°C, se evidenció un agrupamiento de los receptores en el oolema. Este agrupamiento no se manifestó al ser realizada la incubación a bajas temperaturas.

A la luz de estos resultados, una posible alternativa consistiría en que la proteína DE funcionara como una "lectina", provocando el agrupamiento de sitios de unión en el oolema del mismo modo que fué demostrado en el trabajo recién mencionado.

Recientemente, estudios realizados por Leyton y Saling (1989b) demostraron que al incubar espermatozoides de ratón con el componente de la zona pellucida que induce la reacción acrosomal,

la glicoproteína ZP3, se producía un fenómeno de agregación de moléculas. Según las autoras, éste agrupamiento constituiría el mecanismo desencadenante de los eventos intracelulares conducentes a la fusión de las membranas acrosomal externa y plasmática, culminación del proceso exocitótico de la reacción acrosomal. A diferencia de lo que ocurre con el mecanismo involucrado en la reacción acrosomal, es muy poco lo que se conoce acerca del mecanismo responsable de la fusión del espermatozoide con el ovocito (Yanagimachi, 1988b). Un modelo especulativo en base a los resultados aquí presentados, sería la existencia de una interacción de componentes de la membrana del espermatozoide (en este caso, la proteína DE) con sitios en el oolema susceptibles de sufrir eventos de agregación por interacción con el ligando. Este mecanismo, así como en otros sistemas celulares (Espinal, 1987), podría funcionar como desencadenante de los procesos intracelulares culminantes en la fusión de membranas. En el caso particular de la fertilización, culminaría en la fusión de la membrana plasmática del espermatozoide con el oolema.

Tal como ha sido mencionado en la Introducción, el proceso de fusión del espermatozoide con el ovocito es dependiente de la temperatura. Si la agrupación de sitios de unión en el oolema por la interacción con componentes del espermatozoide formara parte de la secuencia de eventos del proceso de fusión, la baja temperatura no permitiría la agregación de los sitios y por lo tanto no se desencadenaría la fusión posterior entre el espermatozoide y el ovocito.

Tal como fue descrito en los Resultados, una característica

interesante de destacar al observar los ovocitos preincubados con DE y tratados con anti-DE en la IIF consistía en que la marca fluorescente no se encontraba distribuida en toda la periferia del ovocito, sino que, por el contrario, en todos los casos observados era posible distinguir un área no marcada. Tal como ha sido descrito previamente para el hamster y ratón (Phillips and Shalgi, 1980; Longo, 1985b), la remoción de la zona pellucida provoca una leve deformación de la forma esférica del ovocito, de modo que la región sobre el huso meiótico resulta en una elevación con forma de cono. Estos resultados pudieron ser confirmados en la rata mediante el empleo de la tinción vital de naranja de acridina, ya que, en los casos en los cuales el plano de observación de los ovocitos permitió visualizar la elevación mencionada, se observó la presencia de los cromosomas en la región elevada. A su vez, en todos aquellos ovocitos con marcación fluorescente en los cuales pudo observarse la región elevada, el área no marcada coincidió sistemáticamente con la elevación. Como ha sido mencionado en la Introducción, a diferencia de lo que ocurre con el resto de la membrana, la región sobre el huso meiótico se encuentra libre de microvellosidades y normalmente no participa en la fusión con el espermatozoide (Johnson et al., 1975; Phillips & Shalgi, 1982). A su vez, el área libre de microvellosidades se caracterizaría por poseer menor concentración de glicoproteínas, lo cual fue revelado por estudios que demostraron la existencia de una menor asociación de la lectina concanavalina A en el área mencionada (Johnson et al., 1975; Wolf & Ziomek, 1983).

Por lo tanto, la presencia de sitios de reconocimiento para la proteína DE en el oolema, conjuntamente con la falta de

localización de los mismos en la región de la membrana que coincidentemente no participa de la fusión con el espermatozoide, resultarían dos fuertes evidencias que favorecerían nuevamente la hipótesis de la participación de DE en el proceso de fusión del espermatozoide con el ovocito.

Entre los pocos estudios realizados hasta el momento con la finalidad de identificar componentes de membrana involucrados en el proceso de fusión de las gametas, se incluyen los realizados por Boldt et al., (1988) en el ratón. En este caso, el tratamiento de ovocitos sin zona pellucida con tripsina o quimotripsina provocó una inhibición de su penetrabilidad (Boldt et al., 1988), la cual se correlacionó con una modificación en el peso molecular de un polipéptido presente en el oolema (Boldt et al., 1989). En base a estos resultados, se propuso la participación de este polipéptido como posible receptor a componentes del espermatozoide.

Trabajos posteriores realizados por Bronson y Fusi (1990ab) con ovocitos sin zona pellucida de hamster, demostraron la presencia en la membrana plasmática de estos ovocitos, de receptores a la secuencia peptídica Arg-Gli-Asp (RGD) contenida en proteínas de matriz extracelular. Dado que el agregado de estos péptidos inhibió el proceso de unión y fusión de espermatozoides humanos y hamster a los ovocitos de hamster, los autores postularon la posible interacción de los receptores con proteínas de matriz extracelular como la fibronectina. Estudios realizados en espermatozoides humanos confirmaron la presencia de este tipo de proteínas sobre la superficie de los mismos (Miranda & Tezón, 1990).

Curiosamente, tal como fue demostrado, el tratamiento de los

ovocitos de rata sin zona pellucida con fibronectina y posteriormente anti-fibronectina durante la IIF, no reveló la presencia de marcas fluorescentes en los mismos. Una posible explicación sería que los ovocitos de rata, a diferencia de los de hamster, no poseyeran este tipo de receptores en su membrana.

En este sentido, resulta interesante el hecho de que un sistema universal de interacción celular, como lo es la unión de proteínas de matriz a sus receptores, haya sido encontrado precisamente en el ovocito de hamster, el cual reviste características únicas de penetrabilidad (Yanagimachi, 1988b) por espermatozoides de otras especies y que no se lo haya detectado en el ovocito de rata, el cual sólo es penetrado por espermatozoides de ratón y hamster.

Si bien a causa de la gran penetrabilidad de los ovocitos de hamster por espermatozoides heterólogos, se ha generado la errónea suposición que el proceso de fusión es absolutamente inespecífico, no es ésta la situación en ovocitos de otras especies. Como se ha mencionado, en el caso particular de la rata, las dos únicas especies cuyos espermatozoides poseen la capacidad de unirse y fusionarse con los ovocitos liberados de la zona pellucida son el ratón, y en forma controvertida según los autores, el hamster (Yanagimachi, 1988b). Por su parte, los espermatozoides humanos no manifiestan ningún tipo de interacción con el oolema de los ovocitos de rata (Quinn, 1982).

En relación con este punto, son significativos los resultados que indicaron la existencia de reacción cruzada del anticuerpo anti-DE con componentes de la región acrosomal de espermatozoides de ratón, hamster, pero no así con los espermatozoides humanos.

Los resultados que demuestran una reacción cruzada de anti-DE

con los espermatozoides de ratón concuerdan con los obtenidos por Brooks y col. (1986) con un anticuerpo policlonal dirigido contra una proteína epididimaria de rata de características sumamente similares a la proteína DE. Si bien los autores no ensayaron la reacción cruzada de dicho anticuerpo con espermatozoides de hamster ó humano, sí demostraron, mediante el empleo de la técnica de inmunoelectrotransferencia, la existencia de reacción cruzada con proteínas epididimarias de ratón. Sin embargo, dado que estas proteínas demostraron poseer un peso molecular aparente menor que DE, no se trataría de la misma proteína sino de proteínas diferentes con determinantes antigénicos en común.

Entre otros componentes postulados como mediadores del proceso de fusión entre las gametas, se encuentra la glucosamina, cuya presencia durante la interacción de espermatozoides de ratón con ovocitos homólogos sin zona pellucida provoca la inhibición de la fusión (Okabe et al., 1989) así como también los componentes ricos en fucosa, los cuales han sido estudiados en el ratón (Boldt et al., 1989) y en el hamster (Dravland & Mortimer, 1988). En el caso particular del ratón, pudo ser demostrado que los componentes ricos en fucosa se encuentran en la membrana del espermatozoide (Boldt et al., 1989). Cabe mencionar que el análisis de los carbohidratos presentes en la proteína DE no reveló la presencia de fucosa entre los mismos (Garberi et al., 1982)

A diferencia de los que ocurre con la etapa de interacción del espermatozoide con la zona pellucida, sobre la cual existen numerosos estudios de identificación de las moléculas participantes (ver Introducción), existen muy pocos estudios

dedicados al estudio de los componentes involucrados en el proceso de fusión en sí. En particular, los resultados que se presentan en este trabajo son sumamente novedosos debido a que, no han sido hasta el momento identificados sitios de reconocimiento en el oolema para proteínas específicas del espermatozoide.

Teniendo en cuenta que han sido postulados distintos elementos como mediadores del proceso de fusión entre las gametas, entre los cuales se encontrarían proteínas de matriz extracelular, polipéptidos, hidratos de carbono, componentes ricos en fucosa y proteínas epididimarias como la que se postula en este trabajo, una posible explicación para la participación de los mismos en la interacción del espermatozoide con el oolema sería la existencia de moléculas involucradas en el proceso de fusión diferentes para cada especie diferente. Por otro lado, existe también la posibilidad de que varios componentes coexistan en una misma especie, siendo la combinación entre ellos lo que otorgaría especificidad a la interacción entre las gametas. En cualquiera de estos casos, tal como también ha sido postulado para los modelos virales (Burger & Verkleij, 1990), ciertos tipos de moléculas podrían ser compartidos entre diversas especies (por ejemplo, similares hidratos de carbono en distintas moléculas proteicas, y que fueran las moléculas proteicas las responsables de la especificidad de interacción), y que en este fenómeno residiera la existencia de fusión heteróloga con mayor o menor restricción.

Si bien actualmente no se dispone de las evidencias suficientes

para discernir entre las posibilidades descritas, resulta interesante mencionar el caso de la fusión de virus a células eucariontes, en el cual han sido demostrados diferentes mecanismos moleculares para distintos virus. Es así que existen proteínas virales que se unen a las células huésped a través de receptores de naturaleza proteica, como la glicoproteína 120 del virus HIV que se une al receptor CD4 presente en macrófagos y linfocitos (Hoekstra, 1990), así como proteínas presentes en otros tipos de virus como la ya mencionada proteína HA del virus de influenza, que muestran especificidad de unión con moléculas de ácido siálico presentes en glicolípidos y glicoproteínas de membrana (Hoekstra, 1990).

Por otro lado, el hecho de que en una misma especie como el hamster, se haya demostrado la participación de distintos componentes (fibronectina: Bronson & Fusi, 1990ab; componentes ricos en fucosa: Dravland & Mortimer, 1988) favorecería la hipótesis de mecanismos coexistentes. Si éste fuera el caso, bastaría la interferencia con uno de ellos para que la fusión no se produjera. Tal es el caso que se plantea actualmente para la interacción del espermatozoide con los componentes de la zona pellucida (Yanagimachi, 1988a; Miller & Ax, 1990).

En conclusión, esta serie de estudios indicó la participación de la proteína DE en el proceso de fusión del espermatozoide con el oolema. Esta afirmación surge de los resultados que demuestran:

- a. la localización de DE en el segmento ecuatorial de los espermatozoides reaccionados, que es aquella región por la cual se produce la fusión con el oolema
- b. la inhibición de la unión y de la posterior fusión de los espermatozoides al oolema, por parte del anticuerpo específico contra DE
- c. la inhibición de la fusión en sí por agregado de la proteína solubilizada
- d. la presencia de sitios de reconocimiento para la proteína DE en el oolema.

En base al modelo propuesto por Yanagimachi (1988b) descrito en la Introducción (sección I.8.5.) para el mecanismo de fusión entre las gametas, la proteína DE sería una de las moléculas que, a través de su interacción con componentes complementarios en el oolema, permitiría la unión de los espermatozoides al mismo. Si bien la proteína DE en sí no parecería poseer características fusogénicas, su interacción con componentes complementarios en la membrana del ovocito podría facilitar la inserción de este tipo de moléculas, siendo estas últimas las responsables de la fusión final de las membranas, o bien podría contribuir al desencadenamiento de los eventos intracelulares culminantes en la fusión de las membranas en sí.

Tal como ha sido mencionado, la proteína DE se asocia a los espermatozoides durante el proceso de maduración que ocurre a medida que los mismos descienden por el epidídimo. Teniendo en cuenta por un lado que los resultados presentados en este trabajo sugerirían una posible participación de DE en el proceso de fusión entre las gametas y, por otro lado que tal como ha sido mencionado, los espermatozoides adquieren la adquisición de capacidad de fusión con el ovocito a medida que los descienden por el epidídimo, se propuso investigar la posible participación de DE en la adquisición de capacidad de fusión que ocurre durante la maduración epididimaria.

Con esta finalidad se estableció, en primer lugar, el perfil de fusión obtenido con espermatozoides de las distintas regiones del epidídimo de rata. Si bien existían trabajos previos realizados en distintas especies en los cuales se estudió la capacidad de fusión de espermatozoides de cada una de las regiones epididimarias a ovocitos sin zona pellucida (Pavlok, 1974; Hinrichsen & Blaquier, 1980; Lacham & Trounson, 1991), no había sido investigada la capacidad de fusión de espermatozoides provenientes de distintos segmentos epididimarios en la rata.

Los resultados indicaron que, así como había sido demostrado para las otras especies, la capacidad de fusión aumentaba en función del grado de maduración de los espermatozoides. Los mismos resultados se encontraron al evaluar la capacidad de sufrir la reacción acrosomal por parte de espermatozoides de distintas regiones epididimarias, utilizando como parámetro la redistribución de la proteína DE. Una posible explicación del aumento en la capacidad de sufrir la reacción acrosomal durante

la maduración, consistía en la aparición de cambios a nivel de la membrana capaces de disminuir la estabilidad de la misma, ya sea por remoción de elementos que confieren rigidez o por inserción de elementos capaces de aumentar su fluidez (Cooper, 1986). Sin embargo, los estudios posteriores ya descritos de Lakoski y col. (1988) revelaron que si bien sólo los espermatozoides más maduros eran capaces de sufrir la reacción acrosomal frente a la inducción por ZP3, existía una similar capacidad de respuesta al ionóforo de Ca^{++} A23187 por parte de los espermatozoides de las tres regiones principales del epidídimo (caput, corpus y cauda). La interpretación realizada por estos autores consistió en que, dada la existencia de una similar preparación de las membranas para manifestar el proceso exocitótico en sí, el aumento en la capacidad de sufrir la reacción acrosomal era producto de un aumento de la capacidad de respuesta a estímulos fisiológicos de la reacción acrosomal.

Como se ha mencionado, la reacción acrosomal es un requisito indispensable para la ocurrencia de la fusión del espermatozoide con el ovocito. Si bien la falta de reacción acrosomal podía ser considerada la causa de la menor capacidad de fusión de los espermatozoides provenientes del caput y corpus proximal encontrada en nuestros estudios, no sería éste el caso de los espermatozoides del corpus distal ya que, luego de la capacitación, los mismos mostraron un porcentaje de espermatozoides con redistribución similar al encontrado entre los espermatozoides totalmente maduros. Teniendo en cuenta que ambas poblaciones presentaban la misma capacidad de sufrir la reacción acrosomal, no era ésta la causa de la menor capacidad de fusión de los espermatozoides del corpus distal. Una posibilidad

era que la menor capacidad de fusión con el ovocito por parte de estos espermatozoides se originara en una falta de componentes específicamente involucrados en el proceso de fusión. En particular, dado que la proteína DE podía tener una función en el proceso de fusión y, teniendo en cuenta que la misma se asociaba a los espermatozoides durante su paso por el epidídimo, se propuso estudiar si el agregado de DE a los espermatozoides del corpus distal provocaba un aumento en la capacidad de fusión de esta población de espermatozoides.

Los resultados indicaron que la proteína DE agregada a los espermatozoides del corpus distal aumentó significativamente la capacidad de fusión a ovocitos sin zona pellucida por parte de estos espermatozoides. Al ser ensayado el efecto de la proteína sobre la capacidad de unión de los espermatozoides del corpus distal al oolema, se observó un aumento en la capacidad de unión de dichos espermatozoides a la superficie de los ovocitos.

Tal como ha sido descrito anteriormente, el anticuerpo anti-DE demostró poseer un efecto inhibitorio tanto sobre la fusión de los espermatozoides a ovocitos sin zona pellucida, como sobre la unión de los mismos al oolema. Al ser comparados los efectos inhibitorios sobre ambos parámetros obtenidos con las mismas dosis de anticuerpo se observó que los porcentajes de inhibición de unión al oolema e inhibición de fusión resultaron coincidentes (Figura V.3a), lo cual podría estar indicando que la inhibición de la penetración de ovocitos sin zona podía ser consecuencia de la interferencia del anticuerpo sobre la unión de los espermatozoides al oolema.

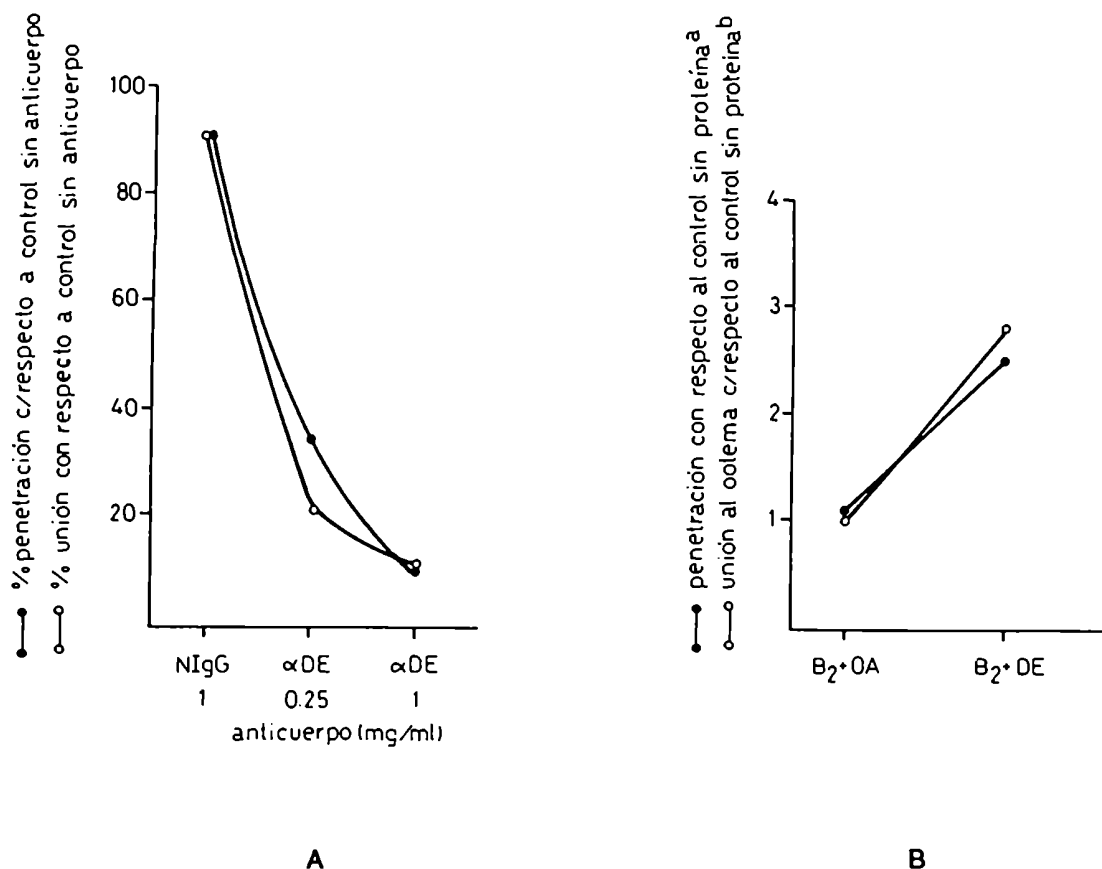


Fig.V.3. Comparación entre los efectos inhibitorios de anti-DE sobre la unión y fusión de los espermatozoides maduros al oolema, y de los efectos estimulatorios del agregado de DE sobre la unión y fusión de los espermatozoides inmaduros al oolema.

(OA) ovoalbúmina

(A) efecto de anti-DE. Se grafican los porcentajes de penetración para cada concentración de anticuerpo con respecto al control sin anticuerpo.

(B) efecto del agregado de DE a espermatozoides inmaduros. (a) n° de veces de estimulación hallado para el porcentaje de penetración en presencia de OA o DE, con respecto al obtenido en RFM sin agregados. (b) n° de veces de estimulación hallados para el porcentaje de ovocitos con espermatozoides unidos en presencia de OA o DE con respecto al obtenido en RFM sin agregados.

Por otro lado, al ser comparados los efectos estimulatorios provocados por el agregado de la proteína DE a espermatozoides del corpus distal tanto sobre la unión y fusión de los mismos al oolema (Figura V.3b), se observó que ambos resultaron del mismo orden. Esta coincidencia podría estar indicando que el aumento de fusión provocado por el agregado de DE a espermatozoides.

Por lo tanto, los efectos inhibitorios obtenidos con el anticuerpo anti-DE sobre la unión de espermatozoides maduros al oolema y posterior fusión con el mismo, conjuntamente con los efectos estimulatorios sobre ambos parámetros provocado por el agregado de proteína DE purificada a espermatozoides inmaduros, resultarían nuevamente una evidencia a favor de la participación de DE en el proceso de fusión. En particular, estos experimentos estarían evidenciando una participación de la proteína en la primera etapa de unión al oolema.

Teniendo en cuenta que los espermatozoides del caput ya poseen proteína DE asociada a su superficie, resulta difícil entender el mecanismo por el cual la proteína agregada podría ejercer una función biológica diferente a la de la proteína DE que ya se encuentra en la membrana. En este sentido, los resultados presentados en el trabajo de Kohane (1980b), si bien indican que el gran aumento de proteína DE sobre los espermatozoides se produce entre las regiones del caput y corpus, también demuestran la existencia de un pequeño incremento adicional en la cantidad de proteína DE entre los espermatozoides del corpus y cauda. Sin embargo, resulta llamativo el hecho de que el aumento mencionado entre estas últimas poblaciones, sea de aproximadamente un 10% con respecto a la proteína ya presente en los espermatozoides del corpus, porcentaje similar al que, de acuerdo a los resultados

aquí presentados, permanecería asociado a la superficie de los espermatozoides totalmente maduros una vez que han sufrido la reacción acrosomal.

En relación a este punto, resulta relevante mencionar la clasificación realizada por Suzuki (1990), según la cual durante el proceso de maduración existirían no solamente verdaderos cambios "madurativos", que son aquellos que conducen a la adquisición de capacidad fertilizante, sino también cambios "estabilizantes", relacionados con la protección de los espermatozoides durante el tránsito en el tracto reproductivo masculino y femenino. Por lo tanto una posibilidad sería que parte de la proteína asociada a los espermatozoides durante la maduración tuviera una función "estabilizante", mientras que otra parte tuviera una función específica en los eventos de interacción de los espermatozoides con el ovocito. En este caso, esta última sería la proteína involucrada en los cambios verdaderamente madurativos de los espermatozoides.

En caso de ser ésta la situación, existirían dos posibles alternativas. Una de ellas consistiría en que la pequeña proporción de DE agregada entre el corpus y el cauda tuviera una interacción diferente con la membrana de los espermatozoides con respecto a la proteína ya presente, siendo esta nueva interacción compatible con su posterior función en el proceso de fusión. Por otro lado, la proteína ya presente en los espermatozoides del caput y corpus podría cumplir un papel estabilizante, y sería liberada de los espermatozoides durante la capacitación.

Esta posibilidad se vería favorecida por los estudios de Kohane y col (1980b) mencionados anteriormente, según los cuales la

interacción de la proteína DE con el resto de los componentes de membrana sería diferente para los espermatozoides de cada una de las regiones epididimarias. Si bien este punto no fue explicado por los autores del trabajo mencionado, esta conclusión surge de experimentos allí presentados en los cuales se demuestra una extracción diferencial de DE por un tratamiento con ClNa 0.4 M. entre los espermatozoides del corpus y cauda epididimario.

Una segunda alternativa consistiría en que la proteína DE asociada a los espermatozoides durante el tránsito por el epidídimo se encontrara permanentemente en interacción con componentes "estabilizantes", los cuales deberían liberarse en las últimas fases del proceso de maduración con el fin de permitir que, una vez liberados los espermatozoides del epidídimo y completado el proceso de capacitación, la proteína pudiera ejercer su función en la interacción con el ovocito.

Teniendo en cuenta los resultados que demuestran una posible participación de DE durante la fusión en forma similar a una "lectina", una posible hipótesis para esta segunda alternativa sería similar a la planteada por Macek y Shur (1988) para la enzima galactosiltransferasa de espermatozoides de ratón. En esta especie, la enzima se encuentra asociada a la membrana plasmática de los espermatozoides y posee una función en la interacción con la zona pellucida al unirse a residuos de N-acetilglucosamina presentes en la misma (Shur & Hall, 1984ab). Durante el pasaje por el epidídimo, se produce el acoplamiento de lactosaminglicanos sobre la enzima (Macek & Shur, 1988). Estos glicanos compiten por el sustrato presente en la zona pellucida, y, solamente al ser removidos de la superficie del espermatozoide

(fenómeno que ocurre durante la capacitación), permiten la unión de los mismos a la zona pellucida. Si bien la enzima se encuentra ya presente en los espermatozoides testiculares, los espermatozoides inmaduros no son capaces de unirse a la zona pellucida de ratón. Se postula que existirían modificaciones de la enzima localizada en los espermatozoides de regiones más proximales, provocada por agentes presentes en el fluido epididimario correspondiente a dichas regiones, siendo éstas modificaciones responsables de que la enzima presente en los espermatozoides inmaduros no pueda liberarse de los glicanos durante la capacitación. Por lo tanto, sería éste un probable mecanismo responsable de la incapacidad de los espermatozoides inmaduros de interactuar con la zona pellucida. Esta explicación se basa en que, solamente después de extensos procedimientos de lavado, los espermatozoides inmaduros adquieren la capacidad de unión a la zona (Macek & Shur, 1988). Dado que los espermatozoides totalmente maduros solamente necesitan sufrir el proceso de capacitación para interactuar con la zona pellucida, se postula entonces que, al menos una parte de los mecanismos estabilizadores, serían revertidos durante los estadios finales de maduración.

Si ésta fuera la situación de la proteína DE, la misma podría interactuar con enzimas presentes en el fluido epididimario (Eddy, 1988) que podrían estar modificando el sitio activo de la proteína en su interacción con el oolema. Este cambio estaría funcionando como un cambio "estabilizante" y sólo sería revertido en los pasos finales de maduración, consistiendo este último paso en un verdadero cambio maduracional (Suzuki, 1990). En este sentido, el agregado a espermatozoides inmaduros de proteína que

no hubiera sufrido la modificación por enzimas epididimarias, mimetizaría el mencionado cambio maduracional.

Cabe destacar que los resultados obtenidos no permiten establecer el mecanismo de interacción de la proteína DE agregada, con los componentes de membrana de los espermatozoides del corpus distal. Resulta interesante mencionar la existencia de trabajos previos realizados en otros laboratorios, en los cuales se midió la unión de proteínas epididimarias a espermatozoides *in vitro*. En estos casos se demostró la existencia de distintos mecanismos de inserción para las diferentes proteínas estudiadas. Entre ellos se incluyó la inserción por secuencias hidrofóbicas contenidas en la proteína (Brooks, 1983), por interacción con receptores (Wong & Tsang, 1982) o por interacción iónica (Rifkin & Olson, 1985). Estudios realizados por Brooks (1986) permitieron el clonado y secuenciación de una proteína con características idénticas (según los mismos autores) a la proteína DE. En este trabajo se comprobó la existencia de un único transcripto para DE, así como también su posible homología con la enzima serina-proteasa carboxypeptidasa Y de hongos. Si bien en base al estudio de la secuencia aminoacídica no pudo ser establecida la presencia de dominios hidrofóbicos que pudieran permitir su directa inserción a la membrana, se reveló la presencia de un gran contenido de cisteína. La gran cantidad de residuos de esta naturaleza determinaría la presencia de numerosos grupos sulfidrilo libres en la proteína, los cuales podrían intervenir en la formación de puentes disulfuro con otros componentes de la membrana constituyendo un mecanismo posible de interacción.

Resulta importante mencionar que, a pesar de numerosos intentos por promover la capacidad fertilizante de espermatozoides inmaduros a través del agregado de secreciones epididimarias (Cooper, 1986) sólo se han obtenido resultados exitosos en pocos casos, siendo los efectos encontrados la promoción de motilidad en los espermatozoides del toro (Acott et al., 1983), la promoción de la unión a la zona pellucida de los espermatozoides de rata (Orgebin-Crist & Fournier-Delpech, 1982; Cuasnicú et al., 1984bc), y la promoción de capacidad fertilizante de los espermatozoides de hamster (González Echeverría et al., 1984; Moore et al., 1987). El hecho que tantos otros intentos no hayan concluído en resultados exitosos (Cooper, 1986) podría residir en que, tal como se ha propuesto describir con las observaciones y resultados presentados, el proceso de maduración en el epidídimo consista en mucho más que el simple acceso a las secreciones epididimarias por parte de espermatozoides inmaduros, pudiendo existir, por ejemplo, fenómenos de interacción de los distintos componentes secretados entre sí y con elementos ya presentes en los espermatozoides.

De todos modos, los resultados aquí descriptos han permitido establecer que, en combinación con toda la serie de cambios responsables del remodelamiento estructural y fisiológico del espermatozoide, la adquisición de proteínas sigue siendo uno de los mecanismos determinantes de la acción del epidídimo en el proceso de maduración de los espermatozoides.

VI. Conclusiones

VI. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se propuso investigar el comportamiento de una glicoproteína epididimaria presente en la membrana de los espermatozoides de rata, la glicoproteína DE, durante el proceso de capacitación de los espermatozoides, así como también su posible participación en el proceso de fertilización.

Los resultados descritos en la Primera Parte indicaron la existencia de una pérdida importante de la proteína DE durante el proceso de capacitación. Sin embargo, ésta pérdida no fué total sino que, una pequeña porción de la proteína DE, permaneció asociada a la membrana plasmática de los espermatozoides capacitados. A su vez, fué posible encontrar en cierto número de espermatozoides, una localización de la proteína diferente a la hallada entre los espermatozoides no capacitados, la cual correspondía a la región del segmento ecuatorial. Los resultados presentados indicaron que la nueva localización de DE era una consecuencia de la migración de la proteína desde la región dorsal hacia el segmento ecuatorial y, que este cambio en la localización, se encontraría vinculado con la ocurrencia de la reacción acrosomal.

Si bien esta primera serie de estudios fué realizada bajo condiciones totalmente *in vitro*, los resultados hallados pudieron ser posteriormente confirmados bajo condiciones *in vivo*.

Dado que la nueva localización de la proteína DE incluía un dominio del espermatozoide específicamente involucrado en el proceso de fusión con el oolema, se sugirió la posibilidad de que

la proteína se encontrara involucrada en esta etapa específica del proceso de fertilización. Mediante la utilización de un anticuerpo policlonal específico contra DE o, alternativamente de la proteína DE purificada, fue posible establecer una posible participación de la misma en el evento de fusión del espermatozoide con la membrana plasmática del ovocito. En particular, los resultados hallados sugerirían una función de DE en la etapa de unión de los espermatozoides al oolema, así como también su posible participación en eventos posteriores a la unión y conducentes a la fusión en sí de las membranas.

Por otro lado, los estudios presentados indicaron la existencia de una interacción de la proteína DE con elementos presentes en la membrana plasmática del ovocito. Estos resultados a su vez constituyeron una nueva evidencia a favor de la participación de la proteína DE en el proceso de fusión.

Teniendo en cuenta que la proteína epididimaria DE se asocia a los espermatozoides durante el proceso de maduración, se propuso finalmente investigar la posible participación de esta proteína en la adquisición de capacidad de fusión con el oolema que ocurre durante el proceso de maduración de los espermatozoides. Los resultados indicaron que el agregado de la misma a espermatozoides del corpus distal (los cuales tendrían la misma capacidad de sufrir la reacción acrosomal que los espermatozoides totalmente maduros) provocó un aumento en su capacidad de fusión. A su vez, este aumento en la fusión sería una consecuencia de una mayor capacidad de unión al oolema por parte de estos espermatozoides incubados con la proteína DE purificada.

Estos resultados, no sólo indicarían una posible función de DE como "factor de maduración", sino que favorecerían la hipótesis de la participación de esta proteína en la etapa de unión de los espermatozoides al oolema que ocurre durante el evento de fusión entre las gametas.

En resumen, los resultados aquí presentados pretenden constituir un nuevo aporte hacia la comprensión de los mecanismos involucrados en la adquisición y posterior expresión de capacidad fertilizante por parte de los espermatozoides de mamíferos. Consecuentemente, dado que para la realización de estos estudios fué utilizada una proteína de origen epididimario, los mismos constituyen una nueva aproximación hacia el estudio de la vinculación existente entre el proceso de maduración epididimaria y los procesos de capacitación y fertilización.

Es la labor de estudios futuros descifrar las bases de la interacción entre los distintos procesos siendo ésta interacción, la determinante en la preparación de los espermatozoides para su función última: la fertilización del ovocito.

Loewinger

— / febrero 1968 —

Bibliografía

BIBLIOGRAFIA

- Abrescia, P.; Lombardi, G.; De Rosa, M.; Quagliozi, L.; Guardiola, J. and Metafora, S. (1985).** Identification and preliminary characterization of sperm-binding protein in normal human semen. *J. Reprod. Fertil.* 73:71-77.
- Acott, T.S. and Hoskins, D.D. (1981).** Bovine sperm forward motility protein: binding to epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod.* 24:234-240.
- Acott, T.S.; Katz, D.F. and Hoskins, D.D. (1983).** Movement characteristics of bovine epididymal spermatozoa: effects of forward motility protein and epididymal maturation. *Biol. Reprod.* 29:389-399
- Adams, C.E. and Chang, M.C. (1962).** Capacitation of rabbit spermatozoa in the Fallopian tube and in the uterus. *J. Exp. Zool.* 151:159-165.
- Ahuja, K.K. (1982).** Fertilization studies in the hamster: The role of cell surface carbohydrates. *Exp. Cell Res.* 140:353-362.
- Ahuja, K.K. (1985).** Carbohydrate determinants involved in mammalian fertilization. *Am. J. Anat.* 174:207-223.
- Allison, A.C. and Hartree, E.F. (1970).** Lysosomal enzymes in the acrosome and their possible role in fertilization. *J. Reprod. Fertil.* 21:501-515.
- Anderson, E. and Albertini, E. (1976).** Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. *J. Cell Biol.* 71:680-686.
- Austin, C.R. (1951).** Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust. J. Sci. Res., Ser. B* 4:581-896.
- Austin, C.R. (1952).** The "capacitation" of the mammalian sperm. *Nature* 170:326
- Austin, C.R. (1956).** Cortical granules in hamster eggs. *Exp. Cell Res.* 10:533-540.
- Austin, C.R. (1960).** Capacitation and the release of hyaluronidase from spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 3:310-311.

Austin, C.R. (1961). *The Mammalian Egg*. Charles C. Thomas. Springfield III.

Austin, C.R. (1970). Ageing and reproduction. Post-ovulatory deterioration of the egg. *J. Reprod. Fert.*, (Suppl.) 12: 39-53.

Austin, C.R. (1982). The egg. En: *Reproduction in Mammals. I: Germ cells and fertilization*. C.R. Austin and R.V. Short, R.V. (eds.), pp 46-62. Cambridge University Press.

Austin, C.R. (1985). Sperm maturation in the male and female genital tracts. En: *Biology of Fertilization, Vol.2*, C.B. Metz and A. Monroy (eds), pp 121-155. Academic Press, New York.

Austin, C.R. and Bishop, M.W.H. (1958). Role of the rodent acrosome and perforatorium in mammals. *Proc. R. Soc. Lond. (Biol.)* 149:241-248.

Austin, C.R. and Braden, A.W.H. (1954). Time relations and their significance in the ovulation and penetration of eggs in rats and rabbits. *Aust. J. Biol. Sci.* 7:179-194.

Austin, C.R. and Braden, A.W.H. (1956). Early reactions of the rodent egg to spermatozoon penetration. *J. Exp. Biol.* 33: 358-365.

Austin, C.R. and Walton, A. (1960). Fertilisation. En: "Marshall's Physiology of Reproduction", Vol. 1, pt 2. A.S. Parkes (ed), pp 310-416. Longmans, Green, London.

Bangham, A.D. (1961). Electrophoretic characteristics of ram and rabbit spermatozoa. *Proc. R. Soc. Lond. (Biol.)*. 155:292-305.

Barros, C. and Berrios, M. (1977). Is the activated spermatozoa really capacitated? *J. Exp. Zool.* 201:65-72.

Barros, C.; Bedford, J.M.; Franklin, L.E. and Austin, C.R. (1967). Membrane vesiculation as a feature of the mammalian acrosome reaction. *J. Cell Biol.* 34:C1-C5.

Barry, M. (1843). Spermatozoa observed within the mammiferous ovum. *Phil. Trans. Royal Soc., London* 133, 33.

Bavister, B.D. (1989). A consistently successful procedure for in vitro fertilization of golden hamster eggs. *Gam. Res.* 23:139-158.

Bedford, J.M. (1963). Changes in the electrophoretic properties of rabbit spermatozoa during passage through the epididymis. *Nature* 200:1178-1180.

Bedford, J.M. (1965). Non-specific tail-tail agglutination of mammalian spermatozoa. *Exp. Cell Res.* 38:654-659.

Bedford, J.M. (1969). Limitations of the uterus in the development of the fertilizing ability (capacitation) of spermatozoa. *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)* 2:128-158.

Bedford, J.M. (1970). Sperm capacitation and fertilization in mammals. *Biol. Reprod. (Suppl.)* 2:128-158.

Bedford, J.M. (1974). Maturation of the fertilizing biology of mammalian spermatozoa in the male and female reproductive tract. *Biol. Reprod.* 11:346-362.

Bedford, J.M. (1975). Maturation, transport and fate of the spermatozoa in the epididymis. En: *Handbook of Physiology*. D.W. Hamilton and R.O. Greep (eds.), Sect.7, Vol. V, pp 303-317. Am. physiol. Soc., Washington, D.C.

Bedford, J.M. (1979) Evolution of the sperm maturation and sperm storage functions of the epididymis. En: *The Spermatozoon*. D.W. Fawcett and J.M. Bedford (eds.), pp 7-21. Urban and Schwarzenberg, Baltimore.

Bedford, J.M. (1982). Fertilization. En: *Reproduction in Mammals*. I: Germ cells and fertilization. Austin, C.R. and Short, R.V. (eds.), pp 128-163, Cambridge University Press.

Bedford, J.M. (1983a). Oocyte structure and the design and function of the sperm head in eutherian mammals. En: *The Sperm Cell*. J. Andre (ed), pp 75-89, Academic Press, London.

Bedford, J.M. (1983b). Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals. *Biol. Reprod.* 28:108-120.

Bedford, J.M. and Calvin, H.I. (1974a). Changes in the S-S linked structures of the sperm tail during epididymal maturation, with comparable observations in sub-mammalian species. *J. Exp. Zool.* 187:181-204.

Bedford, J.M. and Calvin, H.I. (1974b). The occurrence and possible functional significance of S-S crosslinks in sperm heads, with particular reference to eutherian mammals. *J. Exp. Zool.* 188:137-156.

Bedford, J.M. and Cooper, G.W. (1978). Membrane fusion events in the fertilization of vertebrate eggs. En: *Cell Surface Reviews*, Vol. 5. G. Poste and G.L. Nicolson (eds.), pp 65-125. J. North-Holland, Amsterdam.

Bedford, J.M., Moore, H.D.M. and Franklin, L.E. (1979). Significance of the equatorial segment of the acrosome of the spermatozoa in eutherian mammals. *Exp. Cell Res.* 119:119-126.

Bellvé, A.R. and O'Brien, D.A. (1983). The mammalian spermatozoon: structure and temporal assembly. En: *Mechanisms and Control of Animal Fertilization*. J.F. Hartmann (ed.), pp 55-137. Academic Press, New York.

Berger, T. and Clegg, E.D. (1983). Adenylate cyclase activity in porcine sperm in response to female reproductive tract secretions. *Gam. Res.* 7:169-177.

Bhattacharyya, A. and Yanagimachi, R. (1988). Synthetic organic pH buffers can support fertilization of guinea pig eggs, but not as efficiently as bicarbonate buffer. *Gam. Res.* 19:123-129.

Biggers, J.D. (1966). Reproduction in male marsupials. En: *Comparative Biology of Reproduction in Mammals*. I.W. Rowlands (ed.) p 251. Academic Press, London.

Blandau, R.J. and Odor, D.L. (1952). Observations on sperm penetration into the ooplasm and changes in the cytoplasmic components of the fertilizing spermatozoa in the rat ova. *Fertil. Steril.* 3:13-26.

Blandau, R.J. and Rumery, E.R. (1964). The relationship of swimming movements of epididymal spermatozoa to their fertilizing capacity. *Fertil. Steril.* 15:571-579.

Bleil, J. and Wassarman, P. (1980a). Structure and function of the zona pellucida: identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Dev. Biol.* 76:185-202.

Bleil, J. and Wassarman, P. (1980b). Mammalian sperm-egg interaction: Identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing sperm receptor activity. *Cell* 20:873-882.

Bleil, J. and Wassarman, P.M. (1983). Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Dev. Biol.* 95:317-324.

Bleil, J. and Wassarman, P. (1986). Autoradiographic visualization of the mouse egg's sperm receptor bound to sperm. *J. Cell Biol.* 102:1363-1371.

Boettcher, B. (1968). Correlation between human ABO blood group antigens in seminal plasma and on seminal spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 16:49-54.

Boldt, J. and Wolf, D.E. (1986). An improved method for isolation of fertile zona-free mouse eggs. *Gam. Res.* 13:213-222

Boldt, J.; Howe, A.; Parkerson, J.; Gunter, L. and Kuehn, E. (1989). Carbohydrate involvement in sperm-egg fusion in mice. *Biol. Reprod.* 40:887-896.

Boldt, J.; Howe, A.M. and Preble, J. (1988). Enzymatic alteration of the ability of mouse egg plasma membrane to interact with sperm. *Biol. Reprod.* 39:19-27.

Brackett, B.G.; Hall, J.L. and Oh, Y.K. (1978). In vitro fertilizing ability of testicular, epididymal and ejaculated rabbit spermatozoa. *Fertil. Steril.* 29:571-582.

Brandriff, B. and Pedersen, R.A. (1981). Repair of the ultraviolet-irradiated male genome in fertilized mouse eggs. *Science* 211:1431-1433.

Breitbart, H., Rubinstein, S. and Nass-Arden, L. (1985). The role of calcium and Ca^{2+} -ATPase in maintaining motility in ram spermatozoa. *J. Biol. Chem.* 260: 11548-11553.

Brett Finlay, B.; Heffron, F. and Falkow, S. (1989). Epithelial cell surfaces induce *Salmonella* proteins required for bacterial adherence and invasion. *Science* 243: 940-943.

Brinster, R.L. (1965). Studies on the development of mouse embryos in vitro. IV. Interaction of energy sources. *J. Reprod. Fertil.* 10:227-240.

Brobek, U.; Denton, W.L.; Tanahashi, N. and Ebner, K.E. (1967). The isolation and identification of the B protein of lactose synthetase as α -lactalbumin. *J. Biol. Chem.* 242:1391-1397.

Bronson, R.A. and Fusi, F. (1990a). Sperm-oolemal interaction: role of the Arg-Gly-Asp (RGD) adhesion peptide. *Fertil. Steril.* 54(3):527-529.

Bronson, R.A. and Fusi, F. (1990b). Evidence that an Arg-Gly-Asp adhesion sequence plays a role in mammalian fertilization. *Biol. Reprod.* 43:1019-1025.

Brooks, D.E. (1979). Biochemical environment of sperm maturation. En: *The Spermatozoon*. D.W. Fawcett and J.M. Bedford (eds.), pp 23-34. Urban and Schwarzenberg, Baltimore.

Brooks, D.E. (1981). Secretion of proteins and glycoproteins by the rat epididymis: regional differences, androgen-dependence, and effects of protease inhibitors, procaine and tunicamycin. *Biol. Reprod.* 25:1099-1117.

Brooks, D.E. (1983). Selective binding of specific rat epididymal secretory proteins to spermatozoa and erythrocytes. *Gam. Res.* 4:367-376.

Brooks, D.E. ; Means, A.R.; Wright, E.J.; Singh, S.P. and Tiver, K.K. (1986). Molecular cloning of the cDNA for androgen-dependent sperm coating glycoproteins secreted by the rat epididymis. *Eur. J. Biochem.* 161:13-18

Brooks, D.E. and Higgins, S.J. (1980). Characterization and androgen-dependence of proteins associated with luminal fluid and spermatozoa in the rat epididymis. *J. Reprod. Fertil.* 59:262-375.

Brooks, D.E. and Tiver, K. (1983). Localization of epididymal secretory proteins on rat spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 69:651-657.

Brown, C.R.; von Glos, K.I. and Jones, R. (1983). Changes in plasma membrane glycoproteins of rat spermatozoa during maturation in the epididymis. *J. Cell Biol.* 96:256-264.

Bryan, J.H.D. (1974). Capacitation in the mouse: the response of murine acrosomes to the environment of the female genital tract. *Biol. Reprod.* 10:414-421.

Burger, K.N.J. and Verkleij, A.J. (1990). Membrane fusion. *Experientia* 46:631-644.

Burgos, M.H.; Cavicchia, J.C.; Gutierrez, L.S.; Vincenti, A.; Montorzi, M. and Fornes, M.W. (1990). Epididymal maturation of spermatozoa in guinea pig and *Galea Musteloides*. En: *Gamete Interaction: Prospects for Immunocontraception*. Wiley-Liss Inc. (ed.), p 622 (resumen n° 5).

Byskov, A. (1982). Primordial germ cells and regulation of meiosis. En: *Reproduction in Mammals. I: Germ cells and fertilization*. C.R. Austin and R.V. Short, pp 1-16. Cambridge University Press.

Calvin, H.I. and Bedford, J.M. (1971). Formation of disulphide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *J. Reprod. Fertil.*, (Suppl.) 13:65-76

Cameo, M.S. and Blaquier, J.A. (1976). Androgen-controlled specific proteins in the rat epididymis. *J. Endocr.* 69:47-55.

Cameo, M.S.; González Echeverría, M.F.; Blaquier, J.A. and Burgos, M.H. (1986). Immunochemical localization of epididymal protein DE on rat spermatozoa. *Gamete Res.* 15 (3): 247-258.

Capote, C.; Pérez, C.; De Ioannes, A.E.; Barros, C. (1989). Papel de la acrosina en la fecundación. *Arch. Bio. Med. Exp.* 22:R239.

Casillas, E.R.; Elder, C.M. and Hoskins, D.D. (1980). Adenylate cyclase activity of bovine spermatozoa during maturation in the epididymis and the activation of sperm particulate adenylate cyclase by GTP and polyamines. *J. Reprod. Fertil.* 59:292-302.

Chang, M.C. (1951). Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into fallopian tubes. *Nature* 168:697-698.

Chang, M.C. (1957). A detrimental effect of rabbit seminal plasma on the fertilizing capacity of sperm. *Nature* 197:258-259.

Chang, M.C. (1958). Capacitation of rabbit spermatozoa in the uterus with special reference to the reproductive phases of the female. *Endocrinology* 63:619-623

Chang, M.C. (1959). Fertilization of rabbit ova in vitro. *Nature* 184:466-467.

Chapman, D.A. and Killian, G.J. (1984). Glycosidase activities in principal cells, basal cells, fibroblasts and spermatozoa isolated from the rat epididymis. *Biol. Reprod.* 31:627-636.

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

Clarke, G.N.; Clarke, F.M. and Wilson, S. (1982). Actin in human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 26:319-327.

Cooper, G.W. and Bedford, J.M. (1971). Charge density change in the vitelline surface following fertilization of the rabbit egg. *J. Reprod. Fertil.* 25: 431-436.

Cooper, T.G. (1986). *The Epididymis, Sperm Maturation, and Fertilization.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Cossu, G. and Boitani, C. (1984). Lactosaminoglycans synthesized by mouse male germ cells are fucosylated by an epididymal fucosyltransferase. *Dev. Biol.* 102:402-408.

Courtens, J.L. and 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.

Cowan, A.E.; Myles, D.G. and Koppel, D.E. (1986). Lateral diffusion of the PH-20 protein on guinea pig sperm: evidence that barriers to diffusion maintain plasma membrane domains in mammalian sperm. *J. Cell Biol.* 104: 917-923.

Cowan, A.E.; Myles, D.G. and Koppel, D.E. (1991). Migration of the guinea pig sperm membrane protein PH-20 from one localized surface domain to another does not occur by a simple diffusion-trapping mechanism. *Dev. Biol.* 144:189-198.

Cross, N.L.; Morales, P., Overstreet, J.W. and Hanson, F.W. (1986). Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Gam. Res.* 15:213-226.

Cross, N.L.; Morales, P., Overstreet, J.W. and Hanson, F.W. (1988). Induction of the acrosome reaction by the human zona pellucida. *Biol. Reprod.* 38:235-244.

Cuasnicú, P.S. and Bedford, J.M. (1988). Sperm entry into zona less oocytes in the hamster oviduct: implications for the mechanisms involved in the induction of the mammalian acrosome reaction. *Gamete Res.* 21: 85-91.

Cuasnicú, P.S.; González Echeverría, F.; Piazza, A.; Cameo, M.S. and Blaquier, J.A. (1984a). Antibody against epididymal glycoprotein blocks fertilizing ability in rats. *J. Reprod. Fertil.* 72: 467-471.

Cuasnicú, P.S.; González Echeverría, F.M.; Piazza, A.; Piñeiro, L. and Blaquier, J.B. (1984b). Epididymal proteins mimic the androgenic effect on zona pellucida recognition by immature hamster spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 71:427-431

Cuasnicú, P.S.; González Echeverría, F.; Piazza, A. and Blaquier, J.A. (1984c). Addition of androgens to cultured hamster epididymis increases zona recognition by immature spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 70:541-547.

Cummins, J.M. (1976). Effects of epididymal occlusion on sperm maturation in the hamster. *J. Exp. Zool.* 197: 187-190.

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

Dacheaux, J.L. (1980). An in vitro luminal perfusion technique to study epididymal secretion. *IRCS Med. Sci.* 8:137

Dacheux, J.L. and Paquignon, M. (1980). Relations between the fertilizing ability, motility and metabolism of epididymal spermatozoa. *Reprod. Nutr. Dev.* 20:1085-1099.

Dacheux, J.L. and Paquignon, M. (1983). Influence of initiation of forward motility on the fertilizing ability of immature boar spermatozoa in in vivo homologous and heterologous systems of insemination. En: *The Sperm Cell*. J. André (ed.), pp 99-102. Martinus-Nijhoff, The Hague.

Damjanov, I.; Damjanov, A.; Lehto, V.P. and Virtanen, I. (1986). Spectrin in mouse spermatogenesis and embryogenesis. *Dev. Biol.* 114:132-140.

Davis, B.K. (1976). Inhibitory effect of synthetic phospholipid vesicles containing cholesterol on the fertilizing capacity of rabbit spermatozoa. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 152:257-261.

Davis, B.K. (1980). Interaction of lipids with the plasma membrane of sperm cells. I. The antifertilization action of cholesterol. *Arch. Androl.* 5:249-254.

Davis, B.K. (1981). Timing of fertilization in mammals: Sperm cholesterol/phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 78:7560-7564.

Davis, B.K.; Byrne, R. and Hungund, B. (1979). Studies on the mechanisms of capacitation. II. Evidence for lipid transfer between plasma membrane of rat sperm and serum albumin during capacitation in vitro. *Biochim. Biophys. Acta,* 558: 257-266.

Dawson, R.M.C. and Scott, T.W. (1964). Phospholipid composition of epididymal spermatozoa prepared by density gradient centrifugation. *Nature* 202:292-293.

de Graaf, R. (1672). *De Mulierum Organis Generatione Inservientibus.*

Dravland, E. and Joshi, M.S. (1981). Sperm-coating antigens secreted by the epididymis and seminal vesicle of the rat. *Biol. Reprod.* 25:649-658.

Dravland, J.E. and Mortimer, D. (1988). Role for fucose-sulfate-rich carbohydrates in the penetration of zona-pellucida-free hamster eggs by hamster spermatozoa. *Gam. Res.* 21:353-358.

Dukelow, W.R.; Chernoff, H.N. and Williams, W.L. (1969). Fertilizable life of the rabbit ovum relative to sperm capacitation. *Am. J. Physiol.* 213:1397.

Dunbar, B.S.; Budkiewicz, A.B. and Bundman, D.S. (1985). Proteolysis of specific porcine zona pellucida glycoproteins by boar acrosin. Biol. Reprod. 32:619-630.

Düzgünes, N. (1985). Membrane fusion. Subcell. Biochem. 11:195-289.

Eddy, E.M. (1988). The spermatozoon. En: The Physiology of Reproduction. Vol 1. E. Knobil and J. Neill (eds.), pp 27-68. Raven Press, New York.

Eddy, E.M.; Vernon, R.B.; Muller, C.H.; Hahnel, A.C. and Fenderson, B.A. (1985). Immunodissection of sperm surface modifications during epididymal maturation. Am. J. Anat. 174: 225-237.

Edelman, G.M. and Milette, C.F. (1971). Molecular probes of spermatozoon structures. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 68:2436-2440.

Edwards, R.G.; Ferguson, L.C. and Coombs, R.R.A. (1964). Blood group antigens on human spermatozoa. J. Reprod. Fertil. 7:153-161.

Eppig, J. (1982). The relationship between cumulus cell-oocyte coupling, oocyte meiotic maturation, and cumulus expansion. Dev. Biol. 89:268-272.

Espinal, J. (1987). Mechanism of insulin action. Nature 328:574-575.

Farooqui, A.A. and Srivastava, P.N. (1979). Isolation, characterization and the role of rabbit testicular arylsulfatase A in fertilization. Biochem. J. 181:331-337.

Fawcett, D.W. and Holleberg, R.D. (1963). Changes in the acrosome of guinea pig spermatozoa during passage through the epididymis. Z.Zellforsch 60:276-292.

Faye, J.C.; Duguet, L., Mazzuca, M. and Bayard, F. (1980). Purification, radioimmunoassay and immunohistochemical localization of a glycoprotein produced by the rat epididymis. Biol. Reprod. 23:423-432.

Fellous, M.; Gachelin, G.; Buc-Caron, M.H.; Dubois, P. and Jacob, F. (1974). Similar location of an early embryonic antigen on mouse and human spermatozoa. *Dev. Biol.* 41:331-337.

Feutcher, F.A.; Vernon, R.B. and Eddy, E.M. (1981). Analysis of the sperm surface with monoclonal antibodies: Topographically restricted antigens appearing in the epididymis. *Biol. Reprod.* 24:1099-1110.

Florman, H.M. and First, N. (1988). The regulation of acrosomal exocytosis. I. Sperm capacitation is required for the induction of acrosome reactions by the bovine zona pellucida in vitro. *Dev. Biol.* 128:453-463.

Florman, H.M. and Storey, B.T. (1982). Mouse gamete interactions. The zona pellucida is the site of the acrosome reaction leading to fertilization in vitro. *Dev. Biol.* 91:121-130.

Fournier-Delpech, S.; Courot, M. and Dubois, M. (1983). Decreased fertility and motility of spermatozoa from rats immunized with a prealbumin epididymal-specific glycoprotein. *J. Androl.* 6 (4):246-250.

Fournier-Delpech, S. and Courot, M. (1980). Glycoproteins of ram sperm plasma membrane. Relationship of protein having affinity for Con A to epididymal maturation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96: 756-761.

Fournier-Delpech, S.; Danzo, B.J. and Orgebin-Crist, M.C. (1977). Extraction of concanavalin A affinity material from rat testicular and epididymal spermatozoa. *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.* 17:207-213.

Fournier-Delpech, S.; Hamamah, S.; Tananis-Anthony, C.; Courot, M. and Orgebin-Crist, M.C. (1984). Hormonal regulation of zona-binding ability and fertilizing ability of rat epididymal spermatozoa. *Gam. Res.* 9:21-30.

Fraser, L.R. (1983a) Mouse sperm capacitation assessed by kinetics and morphology of fertilization in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 69:419-428.

Fraser, L.R. (1983b). Potassium ions modulate expression of mouse sperm fertilizing ability, acrosome reaction and hyperactivated motility in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 69:539-553.

Fraser, L.R. (1984). Mouse sperm capacitation in vitro involves loss of a surface-associated inhibitory component. *J. Reprod. Fertil.* 72:373-384.

Fraser, L.R. (1990). Sperm capacitation and its modulation. En: *Fertilization in Mammals*. B. Bavister; J. Cummins and E.R.S. Roldán (eds.), pp 141-153. Serono Symposia, USA.

Friend, D.S. (1982). Plasma-membrane diversity in a highly polarized cell. *J. Cell Biol.* 93:243-249.

Friend, D.S. and Fawcett, D.W. (1974). Membrane differentiations in freeze-fractured mammalian sperm. *J. Cell Biol.* 63:641-664.

Fulton, B.P. and Whittingham, D.G. (1978). Activation of mammalian oocytes by intercellular injection of calcium. *Nature* 273:149-151.

Gaddum, P. (1968). Sperm maturation in the male reproductive tract: development of motility. *Anat. Rec.* 161: 471-482.

Gaddum-Rosse, P. (1985). Mammalian gamete interactions: What can be gained from observations on living eggs? *Am. J. Anat.* 174:347-356.

Gagnon, C.; Harbour, D.; de Larmirande, E.; Bardin, C.W. and Dacheaux, J.L. (1984). Sensitive assay detects protein methylesterase in spermatozoa: decrease in enzyme activity during epididymal maturation. *Biol. Reprod.* 30:953-958.

Garberi, J.C.; Fontana, J.D. and Blaquier, J.A. (1982). Carbohydrate composition of specific rat epididymal protein. *Int. J. Androl.* 5:619-626.

Garberi, J.C.; Kohane, A.C.; Cameo, M.S. and Blaquier, J.A. (1979). Isolation and characterization of specific rat epididymal proteins. *Mol. Cell. Endocrinol.* 13: 73-82.

Gaunt, S.; Brown, C.R. and Jones, R. (1983). Identification of mobile and fixed antigens on the plasma membrane of rat spermatozoa using monoclonal antibodies. *Exp. Cell Res.* 144: 275-284.

Gaunt, S.J. (1983). Spreading of a sperm surface antigen within the plasma membrane of the egg after fertilization in the rat. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 75:257-270.

Gilula, N.; Epstein, M. and Beers, W. (1978). Cell-to-cell communication and ovulation: a study of the cumulus cell-oocyte complex. *J. Cell Biol.* 78:58-75

Glabe, C. (1985). Interaction of the sperm adhesive protein, bindin, with phospholipid vesicles. II. Bindin induces the fusion of mixed-phase vesicles that contain phosphatidylcholine and phosphatidylserine in vitro. *J. Cell Biol* 100:800-806.

Glover, T.D. (1961). Disintegrated spermatozoa from the epididymis. *Nature* 190:185-186.

Go, K.J. and Wolf, D.P. (1983). The role of sterols in sperm capacitation. *Adv. Lipid Res.* 20:317-330.

Goldberg, E. (1977). Isozymes in testes and spermatozoa. En: *Current Topics in Biochemical and Medical Research. Vol. 1., Isozymes.* M. Ratazzi; J. Scandalios and G. Whitt (eds.), pp 79-124. Alan R. Liss, New York.

González Echeverría, F.M.; Cuasnicú, P.S.; and Blaquier, J.B. (1982). Identification of androgen-dependent glycoproteins in the hamster epididymis and their association with spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 64:1-7.

González Echeverría, F.M.; Cuasnicú, P.S.; Piazza, A.; Piñeiro, L. and Blaquier, J.B. (1984). Addition of an androgen-free epididymal protein extract increases the ability of immature hamster spermatozoa to fertilize in vivo and in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 71:433-437.

Gordon, M.; Fraser, L.R. and Dandekar, P.V. (1975). The effect of ruthenium red and concanavalin A on the vitelline surface of fertilized and unfertilized rabbit ova. *Anat. Rec.* 181:95-112.

Green, D.P.L. (1976). Induction of the acrosome reaction in guinea pig spermatozoa in vitro by Ca ionophore A23187. *J. Physiol.* 260:18-19.

Green, D.P.L. (1978). The induction of the acrosome reaction in guinea-pig sperm by the divalent metal cation ionophore A23187. *J. Cell Science* 32:137-151.

Grogan, D.E.; Mayer, D.T. and Sikes, J.D. (1966). Quantitative differences in phospholipids of ejaculated spermatozoa and spermatozoa from three different levels of the epididymis of the boar. *J. Reprod. Fertil.* 12:431-436.

Gwatkin, R.B. (1977). *Fertilization Mechanisms in Man and Mammals*. Plenum Press, New York.

Gwatkin, R.B.L. and Williams, D.T. (1977). Receptor activity of the hamster and mouse solubilized zona pellucida before and after the zona reaction. *J. Reprod. Fertil.* 49:55-59.

Hames, B.D. (1981). An introduction to polyacrilamide gel electrophoresis. En: *Gel electrophoresis of proteins*. Eds. B.D. Hames and D. Rickwood (eds.) pp 1-86. IRL Press.

Hamilton, D.W. (1980). UDP-galactose: N-acetylglucosamine galactosyltransferase in fluids from rat testes and epididymis. *Biol. Reprod.* 23: 377-385.

Hamilton, D.W. (1981). Evidence for α -lactalbumine-like activity in reproductive tract fluids of the male rat. *Biol. Reprod.* 25:385-392.

Hamilton, D.W. and Gould, R.P. (1982). Preliminary observations on enzymatic galactosylation of glycoproteins on the surface of rat caput epididymal spermatozoa. *Int. J. Androl. (Suppl.)*, 5:73-80.

Hamilton, D.W.; Wenstrom, J. and Baker, J. (1986). Membrane glycoproteins from spermatozoa: Partial characterization of an integral $M_r \approx 24000$ molecule from rat spermatozoa that is glycosylated during epididymal maturation. *Biol. Reprod.* 34:925-936.

Hammerstedt, R.H.; Keith, A.D.; Hay, S.R.; Deluca, N. and Amann, R.P. (1979). Changes in ram sperm membranes during epididymal transit. *Arch. Biochem. Biophys.* 196:7-12.

Hamner, C.E. and Sojka, N.J. (1967). Capacitation of rabbit spermatozoa: species specificity and organ specificity. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 124:689-694.

Hanada, A. and Chang, M.C. (1972). Penetration of zona-free eggs by spermatozoa of different species. *Biol. Reprod.* 6:300-309.

Harper, M. (1988). Gamete and Zygote transport. En: *The Physiology of Reproduction*. Vol 1. E. Knobil and J. Neill (eds.), pp: 103-134. Raven Press, New York.

Hartree, E.F. (1975) The acrosome-lysosome relationship. *J. Reprod. Fertil.* 44:125-126

Harvey, W. (1651). *De Generatione Animalium*, London.

Healey, D.; Dianda, L.; Moore, J.P.; Mc.Dougal, J.S.; Moore, M.J.; Estess, P.; Buck, D.; Kwong, P.D.; Beverley, P.C.L. and Sattentau, Q.J. (1990). Novel anti-CD4 monoclonal antibodies separate human immunodeficiency virus infection and fusion of CD4+ cells from virus binding. *J. Exp. Med.* 172:1233-1242.

Hecht, N.B.; Bower, P.A.; Waters, S.H.; Yelick, P.C. and Distel, R.J. (1986). Evidence for haploid expression of mouse testicular genes. *Exp. Cell Res.* 164: 183-190.

Herr, J.C. and Eddy, E.M. (1980). Identification of mouse sperm surface antigens by a surface labeling and immunoprecipitation approach. *Biol. Reprod.* 22:1263-1274.

Hertwig, O. (1876). Beiträge zur Kenntniss der Bildung, Befruchtung und Theilung des tierischen Eies. *Gegenbaurs Morph. Jb.* 1:347-434.

Hinrichsen, M.J. and Blaquier, J.A. (1980). Evidence supporting the existence of sperm maturation in the human epididymis. *J. Reprod. Fertil.* 60:291-294.

Hinton, B.T., Brooks, D.T.; Dotts, H.M. and Setchell, B.P. (1981). Effects of carnitine and some related compounds on the motility of rat spermatozoa from the caput epididymis. *J. Reprod. Fertil.* 61:59-64.

Hirao, Y. and Yanagimachi, R. (1978a). Temperature-dependence of sperm-egg fusion and post-fusion events in hamster fertilization. *J. Exp. Zool.* 205:433-438.

Hirao, Y. and Yanagimachi, R. (1978b). Effects of various enzymes on the ability of hamster egg plasma membrane to fuse with spermatozoa. *Gam. Res.* 1:3-12.

Hirao, Y. and Yanagimachi, R. (1979). Development of pronuclei in polyspermic eggs of the golden hamster. Is there any limit to the number of sperm heads that are capable of developing into male pronuclei? Zool. Mag. (Tokyo), 88: 24-33.

Hoekstra, D. (1990). Membrane fusion of enveloped viruses: especially a matter of proteins. J. Bioen. Biomem. 22(2):121-155.

Holt, W.V. (1980). Surface-bound sialic acid on ram and bull spermatozoa: deposition during epididymal transit and stability during washing. Biol. Reprod. 23:847-857.

Holt, V.W. and Dott, H.M. (1980) Chemically induced fusion between ram spermatozoa and avian erythrocytes: an ultrastructural study. J. Ultrastruct. Res. 71:311-320.

Hoskins, D.D and Casillas, E.R. (1975). Functions of cyclic nucleotides in mammalian spermatozoa. En: Handbook of Physiology. Sect.7, Vol. V. D.W. Hamilton and R.O. Greep (eds.), pp 453-460. Am. Physiol. Soc., Washington, D.C.

Hoskins, D.D.; Stephens, D.T. and Hall, M.L. (1974). Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and protein kinase levels in developing bovine spermatozoa. J. Reprod. Fertil. 37: 131-133.

Huang, T.T.F. and Yanagimachi, R. (1984). Fucoidin inhibits attachment of guinea pig spermatozoa to the zona pellucida through binding to the inner acrosomal membrane and equatorial domains. Exp. Cell Res. 153: 363-373.

Huang, T.T.F. and Yanagimachi, R. (1985). Inner acrosomal membrane of mammalian spermatozoa: its properties and possible functions in fertilization. Am. J. Anat. 174:249-268.

Hunter, R.H.F. (1984). Pre-ovulatory arrest and periovulatory redistribution of competent spermatozoa in the isthmus of the pig oviduct. J. Reprod. Fertil. 72: 203-211.

Hunter, A.G. (1969). Differentiation of rabbit sperm antigens from those of seminal plasma. J. Reprod. Fertil. 20:413-418.

Hyne, R.V. and Edwards, K.P. (1985). Influence of 2-deoxyl-D-glucose and energy substrates on guinea-pig sperm capacitation and acrosome reaction. J. Reprod. Fertil. 73:59-69.

Hyne, R.V., Edwards, K.P. and Smith, J.D. (1985). Changes in guinea pig sperm intracellular sodium and potassium content during capacitation and treatment with monovalent ionophore. *Gam. Res.* 12:65-73.

Infante, J.P. and Huszagh, V.A. (1985). Synthesis of highly unsaturated phosphatidylcholine in the development of sperm motility: A role for epididymal glycerol-3-phosphorylcholine. *Mol. Cell Biochem.* 69:3-9.

Irwin, M.; Nicholson, N. Haywood, J.T. and Pourier, G.R. (1983). Immunofluorescent localization of a murine seminal vesicle proteinase inhibitor. *Biol. Reprod.* 28:1201-1206.

Isaacs, W. and Coffey, D.S. (1984). The predominant protein of canine seminal plasma is an enzyme. *J. Biol. Chem.* 259:11520-11526.

Iusem, N.B.; de Larminat, M.A.; Tezón, J.; Blaquier, J.A. and Belocopitow, E. (1984). Androgen dependence of protein N-glycosylation in the rat epididymis. *Endocrinology* 114:1448-1458.

Jackowski, S.; Leibo, S.P. and Mazur, P. (1988). Glycerol permeability of fertilized and unfertilized mouse ova. *J. Exp. Zool.* 212:329-341.

Jackowski, S. and Dumont, J.N. (1979). Surface alterations of the mouse zona pellucida and ovum following in vivo fertilization: Correlation with the cell cycle. *Biol. Reprod.* 20:150-161.

Jaffe, L.A. and Cross, N.L. (1986). Electrical regulation of sperm-egg fusion. *Annu. Rev. Physiol.* 48:191-200.

Jaffe, L.A. and Gould, M. (1985). Polyspermy-preventing mechanisms. En: *Biology of Fertilization*. Vol.3. C.B. Metz and A. Monroy (eds.), pp 223-250. Academic Press, New York.

Jaffe, L.A.; Sharp, A.P. and Wolf, D.P. (1983). Absence of an electrical polyspermy block in the mouse. *Dev. Biol.* 96:317 - 323.

James, K. and Hargreave, T.B. (1984). Immunosuppression by seminal plasma and its possible clinical significance. *Immunology today.* 5:357-363.

Johnson, M.H. (1975). The macromolecular organization of membranes and its bearing on events leading up to fertilization. *J. Reprod. Fertil.* 44:167-184.

Johnson, M.H.; Eager, D.; Uggleton-Harris, A. and Grave, H.M. (1975). Mosaicism in organization of concanavalin A receptors on surface membranes of mouse eggs. *Nature* 257:321-322.

Jones, R. (1978). Comparative biochemistry of mammalian epididymal plasma. *Comp. Biochem. Physiol. (B)*, 61:365-370.

Jones, R.; Fournier-Delpech, S. and Willadson, S.A. (1982). Identification of androgen-dependent proteins synthesised in vitro by the ram epididymis. *Reprod. Nutr. Develop.* 22: 495-504.

Jones, R.; Shalgi, R.; Hoyland, J. and Phillips, D.M. (1990). Topographical rearrangement of a plasma membrane antigen during capacitation of rat spermatozoa in vitro. *Dev. Biol.* 139:349-362.

Jones, R.; Brown, C.R.; von Glos, K.I. and Gaunt, S. (1985). Development of a maturation antigen on the plasma membrane of rat spermatozoa in the epididymis and its fate during fertilization. *Exp. Cell Res.* 156:31-44.

Jones, R.; Phorpramool, C.; Setchell, B.P. and Brown, C.R. (1981). Labelling of membrane glycoproteins on rat spermatozoa collected from different regions of the epididymis. *Biochem. J.* 200:457-460.

Kashiwahara, T.; Tanaka, R. and Matsomoto, T. (1965). Tail to tail agglomeration of bull spermatozoa by phytoagglutinins present in soy beans. *Nature* 201: 831-832.

Katz, D.F. and Yanagimachi, R. (1980). Movement characteristics of hamster spermatozoa within the oviduct. *Biol. Reprod.* 25:785-791.

Katz, D.F. and Yanagimachi, R. (1981). Movement characteristics of hamster and guinea pig spermatozoa upon attachment to the zona pellucida. *Biol. Reprod.* 25:785-791.

Kerek, G.; Biberfeld, P. and Afzelius, B.A. (1973). Demonstration of HL-A antigens, "species" and "semen"-specific antigens on human spermatozoa. *Int. J. Fertil.* 18:145-155.

Killian, G.J. and Amann, R. P. (1977). Immunoelectrophoretic characterization of fluid and sperm entering and leaving the bovine epididymis. *Biol. Reprod.* 9:489-499.

Knudsen, K.A. (1985). The calcium-dependent myoblast adhesion that precedes cell fusion is mediated by glycoproteins. *J. Cell Biol.* 101: 891-897.

Koehler, J.K. (1976). Changes in antigenic site distribution on rabbit spermatozoa after incubation in "capacitating" media. *Biol. Reprod.* 9:444-456.

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

Koehler, J.K.; Nudelman, E.D. and Hakomori, S. (1980). A collagen-binding protein on the surface of ejaculated rabbit spermatozoa. *J. Cell Biol.* 86:529-536.

Kohane, A.C.; Cameo, M.S.; Piñeiro, L.; Garberi, J.C. and Blaquier, J.A. (1980a). Distribution and site of production of specific proteins in the rat epididymis. *Biol. Reprod.* 23:181-187.

Kohane, A.C.; González Echeverría, M.F.; Piñeiro, L. and Blaquier, J.A. (1980b). Interaction of proteins of epididymal origin with spermatozoa. *Biol. Reprod.* 23:737-742.

Kohane, A.C.; Piñeiro, L. and Blaquier, J.A. (1983). Androgen-controlled synthesis of specific protein in the rat epididymis. *Endocrinology* 112:1590-1596.

Koo, G.C.; Stackpole, C.W.; Boyse, E.A.; Hammerling, U. and Lardis, M.P. (1973). Topographical location of H-Y antigen on mouse spermatozoa by immunoelectronmicroscopy. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 70:1502-1505.

Koyama, K. ; Hasegawa, A. and Isojima, S. (1984). Effect of anti-sperm antibody on the in vitro development of rat embryos. *Gam. Res.* 10:143-152.

Lacham, O. and Trounson, A. (1991). Fertilizing capacity of epididymal and testicular spermatozoa microinjected under the zona pellucida of the mouse oocyte. *Mol. Reprod. Dev.* 29:85-93.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Lakoski, K.; Carron, C.P.; Cabot, C.L. and Saling, P. (1988). Epididymal maturation and the acrosome reaction in mouse sperm: response to zona pellucida develops coincident with modification of M42 antigen. *Biol. Reprod.* 38:221-223.

Lambert, H. (1984). Role of sperm-surface glycoproteins in gamete recognition in two mouse species. *J. Reprod. Fertil.* 70:281-284.

Langlais, J. and Roberts, K. (1985). A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gam. Res.* 12:183-224

Larsen, W.; Wert, S. and Brunner, G. (1986). A dramatic loss of cumulus cells gap junctions is correlated with germinal vesicle breakdown in rat oocytes. *Dev. Biol.* 113:517-521.

Lea, O.A.; Petrusz, P. and 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.)* 2:592-607.

Lee, M.A. and Storey, B.T. (1986). Bicarbonate is essential for fertilization of mouse eggs: mouse sperm require it to undergo the acrosome reaction. *Biol. Reprod.* 34:349-356.

Lenz, R.W.; Bellin, M.E. and Aux, R.L. (1983). Rabbit spermatozoa undergo an acrosome reaction in the presence of glycosaminoglycans. *Gam. Res.* 8:11-19.

Leyton, L. and Saling, P. (1989a). 95 kd sperm proteins bind ZP3 and serve as tyrosine kinase substrates in response to zona binding. *Cell* 57:1123-1130.

Leyton, L. and Saling, P. (1989b). Evidence that aggregation of mouse sperm receptors by ZP3 triggers the acrosome reaction. *J. Cell Biol.* 108:2163-2168.

Linck, R.W. (1979). Advances in the ultrastructural analysis of the sperm flagellar axoneme. En: *The Spermatozoon*. D.W. Fawcett and J.M. Bedford (eds.), pp 43-53. Urban and Schwarzenberg, Baltimore.

Lindahl, P.E. and Kihlstrom, J.E. (1952). Alterations in specific gravity during the ripening of bull spermatozoa. *J. Dairy Sci.* 35: 393-402.

Liu, D.Y.; Lopata, A. and Baker, H.W.G. (1990). Use of oocytes that failed to be fertilized in vitro to study human sperm-oocyte interactions: comparison of sperm-olema and sperm-zona pellucida binding, and relationship with results of IVF. *Reprod. Fertil. Dev.* 2:641-650.

Long, J.A. (1912). The living eggs of rats and mice with a description of apparatus for obtaining and observing them. *Univ. Calif. Publ. Zool.* 9:105-136.

Longo, F.J. (1985a), Pronuclear events during fertilization. En: *Biology of Fertilization*. Vol.3. C.B. Metz and A. Monroy (eds.), pp 251-298. Academic Press, New York.

Longo, F.J. (1985b). Fine structure of the mammalian egg cortex. *Am. J. Anat.* 174:303-315.

López, L. and Shur, B.D. (1987). Redistribution of mouse sperm surface galactosyltransferase after the acrosome reaction. *J. Cell Biol.* 105:1663-1670.

López, L.C.; Bayna, E.M.; Litoff, D.; Sharper, N.L.; Sharper, J.H. and Shur, B.D. (1985). Receptor function of mouse sperm surface galactosyltransferase during fertilization. *J. Cell Biol.* 101:1501-1510

Lowry, O.H.; Rosenbrough, N.J.; Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.

Lubicz-Nawrocki, C.M. (1970). Transuterine migration of spermatozoa in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *J. Reprod. Fertil.* 23:197-201.

Lucy, J.A. and Ahkong, Q.F. (1986). An osmotic model for the fusion of biological membranes. *FEBS Lett* 199:1-11.

Macek, M.B. and Shur, B.D. (1988). Protein-carbohydrate complementarity in mammalian gamete recognition. *Gam. Res.* 20:93-109.

Maddock, M.B. and Dawson, W.D. (1974). Artificial insemination of deermice with sperm from other rodent species. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 31:621-634.

Mahanes, M.S.; Ochs, D.L. and Eng, L.A. (1986). Cell calcium of ejaculated rabbit spermatozoa before and following in vitro capacitation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 134: 664-670.

Malpighi, M. (1673). *De Formatione Pulli In Ovo*, Bologna.

Meizel, S. and Turner, K.O. (1986). Glycosaminoglycans stimulate the acrosome reaction of previously capacitated hamster sperm. *J. Exp. Zool.* 237:137-139.

Merril, C.R.; Goldman, D.; Sedman, S.A. and Ebert, M.H. (1981). Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science* 211:1437-1438

Milette, C.F. (1977). Distribution and mobility of lectin binding sites on mammalian spermatozoa. En: *Immunobiology of Gametes*, M. Edididn and M.H. Johnson (eds.), pp 51-71. Cambridge University Press, Cambridge.

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

Miranda, P.V. and Tezón, J.G. (1990). Equatorial segment fibronectin is a marker for sperm maturation in humans. En: *Gamete Interaction: Prospects for Immunocontraception*. Wiley-Liss Inc. (ed.), p 623 (resumen n° 6).

Miyazaki, S.; Hashimoto, N.; Yoshimoto, Y.; Kishimoto, T.; Igusa, Y. and Hiramoto, Y. (1986). Temporal and spatial dynamics of the periodic increase in intercellular free calcium and fertilization of golden hamster eggs. *Dev. Biol.* 118:259-267.

Miyazaki, S. and Iguza, Y. (1981). Fertilization potential in golden hamster eggs consists of recurring hyperpolarization, *Nature* 290: 702-704.

Mohri, H. and Yanagimachi, R. (1980). Characteristics of motor apparatus in testicular, epididymal and ejaculated spermatozoa: A study using demembrated sperm model. *Exp. Cell Res.* 127:191-196

Moller, C.C. and Wassarman, P. (1989). Characterization of a proteinase that cleaves zona pellucida glycoprotein ZP2 following activation of mouse eggs. *Dev. Biol.* 132:103-112.

Moore, H.D.M and Hibbits, K.G. (1975). Isoelectric focusing of boar spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 44:329-332.

Moore, H.D.M. (1979). The net negative surface charge of mammalian spermatozoa as determined by isoelectric focusing. Changes following sperm maturation, ejaculation, incubation in the female tract, and after enzyme treatment. *Int. J. Androl.* 2:244-262.

Moore, H.D.M. (1980). Localization of specific glycoproteins secreted by the rabbit and hamster epididymis. *Biol. Reprod.* 22:705-718.

Moore, H.D.M. (1981). Glycoproteins secretions of the epididymis in the rabbit and hamster: localization on epididymal spermatozoa and the effect of specific antibodies on fertilization in vivo. *J. Exp. Zool.* 215:77-85.

Moore, H.D.M. and Bedford, J.M. (1983). The Interaction of Mammalian Gametes in the Female. En: Mechanism and Control of Animal Fertilization. J. Hartmann (ed.), pp 453-497. Academic Press, New York.

Moore, H.D.M. and Hartmann, T.D. (1984). Localization by monoclonal antibodies of various surface antigens of hamster spermatozoa and the effect of antibody on fertilization in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 70:175-183.

Moore, H.D.M.; Smith, C.A. and Hartman, T.D. (1987). The role of the epididymal epithelium in the development of Mammalian sperm-fertilizing capacity in vivo and in vitro. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 513:195-203.

Morales, P., Cross, N.L. (1989). A new procedure for determining acrosomal status of very small numbers of human sperm. *J. Histochem Cytochem* 37:1291-1292

Motomura, M. and Toyoda, Y. (1980). Scanning electron microscopic observations on the sperm penetration through the zona pellucida of mouse oocytes fertilized in vitro. *Jpn. J. Zootech. Sci.* 51:595-601.

Mrnsy, R.J.; Siiteri, J.E. and Meizel, S. (1984). Hamster sperm Na⁺/K⁺ adenosine triphosphatase: increased activity during capacitation in vitro and its relationship to cyclic nucleotides. *Biol. Reprod.* 30:573-584.

Mrnsy, R.J.; Siiteri, J.E. and Meizel, S. (1984). Hamster sperm Na⁺/K⁺ adenosine triphosphatase: increased activity during capacitation in vitro and its relationship to cyclic nucleotides. *Biol. Reprod.* 30:573-584.

Müller-Esterl, W. and Fritz, H. (1981). Sperm acrosin. En: *Methods in Enzymology*. Vol. 80. L. Lorand (ed), pp 621-632. Academic Press, New York.

Mumford, R.A.; Hartmann, J.F.; Ashe, B.M. and Zimmerman, M. (1981). Proteinase activities of the golden hamster eggs and cells of the cumulus oophorus. *Dev. Biol.* 81:332-335.

Myles, D.; Hyatt, H. and Primakoff, P. (1987). Binding of both acrosome-intact and acrosome-reacted guinea pig sperm to the zona pellucida during in vitro fertilization. *Dev. Biol.* 121:559-567.

Myles, D.G.; Primakoff, P. and Koppel, D.E. (1984). A localized surface protein of guinea pig sperm exhibits free diffusion in its domain. *J. Cell Biol.* 98:1905-1909.

Myles, D.G.; Koppel, D.E.; Cowan, A.E.; Phelps, B.M. and Primakoff, P. (1987). Rearrangement of sperm surface antigens prior to fertilization. En: *Cell Biology of the Testis and Epididymis*. Ann. N. Y. Acad. Sci. Vol. 513. M.C. Orgebin-Crist and B.J. Danzo (eds.), pp 262-273. New York Academy of Sciences, New York.

Nagae, T.; Yanagimachi, R.; Srivastava, P.N. and Yanagimachi, H. (1986). Acrosome reaction in human spermatozoa. *Fertil. Steril.* 45:701-707.

Naish, S.J.; Perreault, S.D.; Foehner, A.L. and Zirkin, B.R. (1987). DNA synthesis in the fertilizing hamster sperm nucleus: Sperm template availability and egg cytoplasmic control. *Biol. Reprod.* 36:245-253.

Nevo, A.C.; Michaeli, I. and Schindler, H. (1961). Electrophoretic properties of bull and rabbit spermatozoa. *Exp. Cell Res.* 23:69-83

Nicolson, G. and Yanagimachi, R. (1974). Mobility and restriction of mobility of plasma membrane lectin-binding components. *Science* 184:1294-1296.

Nicolson, G.; Lacorbiere, M. and Yanagimachi, R. (1972). Quantitative determination of plant agglutinin membrane sites on mammalian spermatozoa. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 141:661-663.

Nicolson, G.E; Broginski, A.B.; Beattie, G. and Yanagimachi, R. (1979). Cell surface changes in the proteins of rabbit spermatozoa during epididymal passage. *Gam. Res.* 2:153-162.

Nicolson, G.L.; Usui, N.; Yanagimachi, R.; Yanagimachi, H. and 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.* 74:950-962.

Nicolson, G.L.; Yanagimachi, R. and Yanagimachi, H. (1975). Ultrastructural localization of lectin-binding sites on the zonae pellucidae and plasma membranes of mammalian eggs. *J. Cell Biol.* 66:263-273.

Nicolson, G. and Yanagimachi, R. (1972). Terminal saccharides on sperm plasma membranes. Identification by specific agglutinins. *Science* 177:276-279.

Nikolopoulau, M.; Soucek, D.A. and Vary, J.C. (1985). Changes in the lipid content of boar plasma membranes during epididymal maturation. *Biochem. Biophys. Acta* 815:486-498.

Noyes, R.W.; Walton, A. and Adams, C.E. (1958). Capacitation of rabbit spermatozoa. *J. Endocrinol.* 17:374-380.

O'Rand, M.G. and Fisher, S.J. (1987). Localization of zona pellucida binding sites on rabbit spermatozoa and induction of the acrosome reaction by solubilized zona. *Dev. Biol.* 119:551-559.

O'Rand, M.G.; Matthews, J.E.; Welch, J.E. and Fisher, S.J. (1985). Identification of zona binding proteins of rabbit, pig, human and mouse spermatozoa on nitrocellulose blots. *J. Exp. Zool.* 235:423-428.

O'Rand, M.G.; Welch, J.E. and Fisher, S.J. (1986). Sperm membrane and zona pellucida interactions during fertilization. En: Molecular and Cellular Aspects of Reproduction. D.S. Dhindsa and O.P Bahl (eds.), pp. 131-144. Plenum Press, New York.

Oikawa, T.; Sendai, Y.; Kurata, S. and Yanagimachi, R. (1988). A glycoprotein of epididymal origin alters biochemical properties of the zona pellucida of hamster egg. Gam. Res.19:113-122.

Okabe, M.; Nagira, M.; Kawai, Y.; Matzno, S.; Mimura, T. and Mayumi, T. (1990). A human sperm antigen possibly involved in binding and/or fusion with zona-free hamster eggs. Fertil. Steril. 54(6):1121-1126.

Okabe, M.; Yagasaki, M.; Matzno, S.; Nagira, M.; Kohama, Y. and Mimura, T. (1989). Glucosamine enhanced sperm-egg binding but inhibited sperm-egg fusion in mouse. Experientia 45:193-194.

Okabe, M.; Yagasaki, M.; Oda, H.; Matzno, S.; Kohama, Y. and Mimura, T. (1988). Effect of a monoclonal anti-mouse sperm antibody on the interaction of mouse sperm with zona-free mouse and hamster eggs. J. Reprod. Immunol. 13:211-219.

Oliphant, G. (1976). Removal of sperm-bound seminal plasma components as a prerequisite to induction of the acrosome reaction. Fertil. Steril. 27:28-38.

Oliphant, G. and Brackett, B.G. (1973a). Capacitation of mouse spermatozoa in media with elevated ionic strength and reversible decapacitation with epididymal extracts. Fertil. Steril. 24:948-955.

Oliphant, G. and Brackett, B.G. (1973b). Immunological assessment of surface changes of rabbit sperm undergoing capacitation. Biol. Reprod.9: 404-414.

Oliphant, G. and Singhas, C.A. (1979). Iodination of rabbit sperm plasma membrane: relationship of specific surface proteins to epididymal function and sperm capacitation. Biol. Reprod. 21:937-944.

Oliphant, G.; Reynolds, A.B. and Thomas, T.S. (1985). Sperm surface components involved in the control of the acrosome reaction. Am J. Anat. 174:269-283.

Olson, G.E. and Danzo, B.J. (1981). Surface changes in rat spermatozoa during epididymal transit. *Biol. Reprod.* 24:431-443.

Olson, G.E. and Hamilton, D.W. (1978). Characterization of the surface glycoproteins of rat spermatozoa. *Biol. Reprod.* 19:26-35.

Olson, G.E. and Orgebin-Crist, M.C. (1982). Sperm surface changes during epididymal maturation. En: *The Cell Biology of the Testis*. Ann. N. Y. Acad. Sci. Vol. 383. C.W. Bardin and R.J. Sherins (eds.), pp 372-290. New York Academy of Sciences, New York.

Orgebin-Crist, M.C. (1969). Studies on the function of the epididymis. *Biol. Reprod. (Suppl.)* 1:155-175.

Orgebin-Crist, M.C. and Fournier-Delpech, S. (1982). Sperm-egg interaction. Evidence for maturational changes during epididymal transit. *J. Androl.* 3:429-433.

Orgebin-Crist, M.C.; Danzo, B.J. and Davies, J. (1975). Endocrine control of the development and maintenance of sperm fertilizing ability in the epididymis. En: *Handbook of Physiology. Sect.7, Vol. V.* D.W. Hamilton and R.O. Greep (eds.) pp 319-338. Am. Physiol. Soc., Washington, D.C.

Orgebin-Crist, M.C. and Hoffmann, L.H. (1976). The effect of testosterone and testosterone metabolites on epididymal function. En: *Regulatory mechanisms of male reproductive physiology.* C.H. Spilman, T.J. Lobl and K.T. Korton (eds.), pp 141-142. Excerpta Medica, Amsterdam, Elsevier.

Overstreet, J.W. and Cooper, G.W. (1979). The time and location of the acrosome during sperm transport in the female rabbit. *J. Exp. Zool.* 209:97-104

Overstreet, J.W.; Cooper, G.W. and Katz, D.F. (1978). Sperm transport in the reproductive tract of the female rabbit. II: The sustained phase of transport. *Biol. Reprod.* 19:115-132.

Paonessa, G.; Metafora, S.; Tajana, G.; Abrescia, P.; de Santis, A.; Gentile, V. and Porta, R. (1984). Transglutaminase-mediated modifications of the rat sperm surface in vitro. *Science* 226:852-855.

Papahadjopoulos, D. (1978). Calcium-induced phase changes and fusion in natural and model membranes. *Cell Surf. Rev.* 5:765-790.

Pavlok, A. (1974). Development of the penetrating of mouse spermatozoa in vivo and in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 36:203-205.

Phelps, B.M.; Primakoff, P.; Koppel, D.E.; Low, M.G. and Myles, D.G. (1988). Restricted lateral diffusion of PH-20, a PI-anchored sperm membrane protein. *Science* 240:1780-1782.

Phillips, D.M. (1977a) Surface of the equatorial segment of the mammalian acrosome. *Biol. Reprod.* 16:128-137.

Phillips, D.M. (1977b). Mitochondrial disposition in mammalian spermatozoa. *J. Ultrastr. Res.* 58:144-154.

Phillips, D.M. and Shalgi, R. (1980). Surface architecture of the mouse and hamster zona pellucida and oocyte. *J. Ultrastr. Res.* 72:1-12.

Phillips, D.M. and Shalgi, R. (1982). Sperm penetration into rat ova fertilized in vivo. *J. Exp. Zool.* 221:373-378

Piko, L. (1967). Immunological phenomena in the reproductive process. *Int. J. Fertil.* 12:377-383.

Poirier, C.R. and Nicolson, N. (1984). Distribution of a proteinase inhibitor of epididymal origin in the tissues and secretions of the male reproductive tract of mice. *J. Exp. Zool.* 230:465-472.

Poirier, G.R. and Jackson, J. (1981). Isolation and characterization of two proteinase inhibitors from the male reproductive tract of mice. *Gam. Res.* 4:555-569.

Poulos, A.; Volgmayr, J.K. and White, I.G. (1973). Phospholipid changes in spermatozoa during passage through the genital tract of the bull. *Biochem. Biophys. Acta* 306:194-202.

Primakoff, P. and Myles, D. (1983). A map of the guinea pig sperm surface constructed with monoclonal antibodies. *Dev. Biol.* 98:417-428.

Primakoff, P.; Hyatt, H. and Tredick-Kline, J. (1987). Identification and purification of a sperm surface protein with a potential role in sperm-egg membrane fusion. *J. Cell Biol.* 104:141-149.

Purvis, K.; Cusan, L.; Attramadal, H.; Ege, A. and Hansson, V. (1982). Rat sperm enzymes during epididymal transit. *J. Reprod. Fertil.* 65:381-387.

Quasba, P.K.; Hewlett, I.K. and Byers, S. (1983). The presence of the milk protein, α -lactalbumin and its mRNA in the rat epididymis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 117:306-312.

Quinn, P.J. (1982). Polyethylene glycol-induced attachment of human spermatozoa to zona-free rat ova in vitro. *Aust. J. Biol. Sci.* 35:179-186.

Rahi, H.; Sheikhejade, G. and Srivastava, P.N. (1983). Isolation of the inner acrosomal-nuclear membrane complex from rabbit spermatozoa. *Gamete Res.* 7:215-225.

Ralt, D.; Goldenberg, M.; Fetterolf, P.; Thompson, D.; Dor, J.; Mashiach, S.; Garbers, D.L. and Eisenbach, M. (1991). Sperm attraction to a follicular factor(s) correlates with human egg fertilizability. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 88:2840-2844.

Rifkin, J. and Olson, G.E. (1985). Characterization of maturation-dependent extrinsic proteins of the rat sperm surface. *J. Cell Biol.* 100:1582-1591.

Ringuette, M.J.; Sobieski, D.A.; Chamow, S.M. and Dean, J. (1986). Oocyte-specific gene expression: molecular characterization of a cDNA coding for ZP3, the sperm receptor of the mouse zona pellucida. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 83:4381-4345.

Rodman, T.C.; Pruslin, F.H.; Hoffman, H.P. and Alfrey, V.G. (1981). Turnover of basic chromosomal protein in fertilized eggs: A cytoimmunochemical study of events in vivo. *J. Cell Biol.* 90:351-361

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

Roldan, E.R.S., Vitullo, A.D., Merani, M.S. and Lawzewitsch, I.V. (1985). Cross-fertilization in vivo and in vitro between three species of Vesper mice, *Calomys* (Rodentia, Cricetidae). *J. Exp. Zool.* 233:433-442.

Russet, L.D. (1979). Spermatid-Sertoli tubulobulbar complexes as devices for elimination of cytoplasm from the head region of late spermatids of the rat. *Anat. Rec.* 194:233-246.

Russet, L.D. (1980). Sertoli-germ cell interactions: a review. *Gam. Res.* 3:179-202.

Russet, L.D.; Peterson, R.N.; Hunt, W. and Strack, L.E. (1984). Post-testicular surface modifications and contributions of reproductive tract fluids to the surface polypeptide composition of boar spermatozoa. *Biol. Reprod.* 30:959-978.

Saling, P. (1981). Involvement of a trypsin-like activity in binding of mouse spermatozoa to zona pellucida. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 78:6231-6235.

Saling, P. (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.

Saling, P. and Bedford, J.M. (1981). Absence of species-specificity for mammalian sperm capacitation in vivo. *J. Reprod. Fertil.* 63:119-123.

Saling, P.M. and Storey, B.T. (1979). Mouse gamete interactions during fertilization in vitro. Chlorotetracycline as a fluorescent probe for the mouse sperm acrosome reaction. *J. Cell Biol.* 83:544-555.

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

Sanjurjo, C.; Davidowsky, A.; Cameo, M.S; González Echeverría, F. and Blaquier, J.A. (1990). Participation of human epididymal sperm coating antigens in fertilization. *J. Androl.* 11 (5):476 - 483.

Sato, K. and Blandau, R.J. (1979). Time and process of sperm penetration into cumulus-free mouse eggs fertilized in vitro. *Gam. Res.* 2:295-304.

Sattentau, Q.J. and Weiss, R.A. (1988). The CD4 antigen: physiological ligand and HIV receptor. *Cell* 52:631-635.

Schatten, H.; Schatten, G.; Mazia, D.; Balczon, R. and Simerly, C. (1986). Behavior of centrosomes during fertilization and cell division in mouse oocytes and in sea urchin eggs. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 83:105-109.

Schuel, H. (1985). Functions of egg cortical granules. En: *Biology of Fertilization.* Vol.3. C.B.Metz and A. Monroy (eds.), pp 1-43. Academic Press, New York.

Scott, T.W.; Volgmayr, J.K. and Setchell, B.P. (1967). Lipid composition and metabolism in testicular and ejaculated ram spermatozoa. *Biochem. J.* 102:456-461.

Setchell, B.P. (1982) Spermatogenesis and Spermatozoa. En: *Reproduction in Mammals. I:Germ cells and fertilization.* C.R. Austin and R.V. Short (eds.), pp 63-101. Cambridge University Press.

Shalgi, R. and Kraicer, P.F. (1978). Timing of sperm transport, sperm penetration and cleavage in the rat. *J. Exp. Zool.* 204:353-360.

Shalgi, R. and Phillips, D.M. (1980a). Mechanics of in vitro fertilization in the hamster. *Biol. Reprod.* 23:433-448.

Shalgi, R. and Phillips, D.M. (1980b). Mechanics of sperm entry in cycling hamsters. *J. Ultrastruct. Res.* 71:154-161.

Shalgi, R. and Phillips, D.M. (1982). Sperm penetration into rat ova fertilized in vitro. *J. Androl.* 3:382-387.

Shalgi, R. and Phillips, D.M. (1988). Motility of rat spermatozoa at the site of fertilization. *Biol. Reprod.* 39:1207-1213.

Shalgi, R.; Kaplan, R. Nebel, L. and Kraicer, F. (1981). The male factor in fertilization of rat eggs in vitro. *J. Exp. Zool.* 217:319-402.

Shenk, S.L. (1878). *Das Saugetierei Künstlich befruchtet ausserhalb des Muttertieves.* Mitt Embryol. Inst. Univ. Wien, 1877-1885.

Shur, B.D. and Hall, N.G. (1982a). Sperm-surface galactosyltransferase activities during in vitro capacitation. *J. Cell Biol.* 95:567-573.

Shur, B.D. and Hall, N.G. (1982b). A role for mouse sperm surface galactosyltransferase in sperm binding to the egg zona pellucida, *J. Cell Biol.* 95:574-579.

Singer, S.J. and Nicholson, G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175:720-731.

Singh, J.P.; Babcock, D.F. and Lardy, H.A. (1978). Increased calcium-ion influx is a component of capacitation of spermatozoa. *Biochem. J.* 172:549-556.

Siracusa, G.; De Felici, M. and Salustri, A. (1985). The proliferative and meiotic history of mammalian female germ cells. En: *Biology of Fertilization*. Vol.1. C.B. Metz and A. Monroy (eds.), pp 253-297. Academic Press, New York.

Skudlarek, M.D. and Orgebin-Crist, M.C. (1986). Glycosidases in cultured rat epididymal cells: enzyme activity, synthesis and secretion. *Biol. Reprod.* 35:167-178.

Soucek, D.A.; Nikolopoulou, M.; Vary, J.C. and Zirkin, B. (1985). Fluidity measurements of sperm membranes from in vitro capacitated and acrosome reacted boar sperm. *J. Cell Biol.* 101:263a.

Stein, D.M. and Fraser, L.R. (1984). Cyclic nucleotide metabolism in mouse epididymal spermatozoa during capacitation in vitro. *Gam. Res.* 10:283-299.

Stephens, D.T., Wang, J.L. and Hoskins, D.D. (1979). The phosphodiesterase of bovine spermatozoa: multiple forms, kinetic properties and changes during development. *Biol. Reprod.* 20:438-491.

Stephoe, P.C. and Edwards, R.G. (1978). Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* ii:366.

Suarez, S.S.; Katz, D.F. and Overstreet, J.W. (1983). Movement characteristics and acrosomal status of rabbit spermatozoa recovered at the site and time of fertilization. *Biol. Reprod.* 29:1277-1287.

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

Sullivan, R. and Bleau, G. (1985). Interaction of isolated components from mammalian sperm and egg. *Gam. Res.* 12:101-116.

Suominen, J. and Setchell, B.P. (1972). Enzymes and trypsin inhibitors in the rete testis fluid of rams and boars. *J. Reprod. Fertil.* 30:235-245.

Suzuki, F. (1981). Changes in intramembranous particle distribution in epididymal spermatozoa of the boar. *Anat. Rec.* 199:361-376.

Suzuki, F. (1990). Morphological aspects of sperm maturation: modification of the sperm plasma membrane during epididymal transport. En: *Fertilization in mammals*. B. Bavister, J. Cummins and E.R.S. Roldán (eds.), pp 65-75. Serono Symposia, USA.

Suzuki, F. and Nagano, T. (1980). Epididymal maturation of rat spermatozoa studied by thin sectioning and freeze-fracture. *Biol. Reprod.* 22:1219-1231.

Suzuki, F. and Yanagimachi, R. (1989). Changes in the distribution of intramembranous particles and filipin-reactive membrane sterol during in vitro capacitation of golden hamster spermatozoa. *Gam. Res.* 23:335-347.

Szollosi, D. (1967). Development of cortical granules and the cortical reaction in rat and hamster eggs. *Anat. Record* 159:431-446.

Talbot, P. (1985). Sperm penetration through oocyte investments in mammals. *Am. J. Anat.* 174:331-346.

Talbot, P. and Chacon, R.S. (1980). A triple stain technique for scoring acrosome reaction of human sperm. *J. Exp. Zool.* 215:201-208.

Talbot, P. and Franklin, L.E. (1978). Surface modifications of guinea-pig sperm during in vitro capacitation: an assessment using lectin-induced agglutination of living sperm. *J. Exp. Zool.* 203:1-14.

Talbot, P.; Summers, R.G.; Hylander, B.L.; Keough, E.M. and Franklin, L.E. (1976). The role of calcium in the acrosome reaction: an analysis using ionophore A23187. *J. Exp. Zool.* 198:383-392.

Tamblyn, T.M. (1980). Identification of actin in boar epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod.* 22:727-734.

Tash, J.S. and Means, A.R. (1983). Cyclic adenosin 3',5' monophosphate, calcium and protein phosphorylation in flagella motility. *Biol. Reprod.* 28:75-104.

Terner, C.; MacLaughlin, J. and Smith, B.R. (1975). Changes in lipase and phosphatase activities of rat spermatozoa in transit from the caput to the cauda epididymis. *J. Reprod. Fertil.* 45:1-8.

Tesarik, J. (1984). Topographic relations of intramembranal particle distribution patterns in human sperm membranes. *J. Ultrastruct. Res.* 89:42-55.

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

Tezón, J.G.; Vázquez, M.H.; Piñeiro, L.; de Larminat, M.A. and Blaquier, J.A. (1985a). Identification of androgen-induced proteins in human epididymis. *Biol. Reprod.* 32:584-590.

Tezón, J.G.; Ramella, R.; Cameo, M.S.; Vázquez, M.H. and Blaquier, J.A. (1985b). Immunochemical localization of secretory antigens in the human epididymis and their association with spermatozoa. *Biol. Reprod.* 32:591-597.

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

Toowicharanont, P. and Chulavatnatol, M. (1983). Characterization of sialoglycoproteins of rat epididymal fluid and spermatozoa by periodate-tritiated borohydride. *J. Reprod. Fertil.* 67:133-141.

Töpfer-Petersen, E.; Friess, A.E.; Nguyen, H. and Schill, W.S. (1985). Evidence for a fucose-binding protein in boar spermatozoa. *Histochemistry* 83:139-145.

Töpfer-Petersen, E.; Friess, A.E.; Sinowal, F.; Bielez, S. and Schill, W.S. (1985). Immunocytological characterization of the outer acrosomal membrane (OAM) during acrosome reaction in boar. *Histochemistry* 82:113-120.

Töpfer-Petersen, E.; Friess, A.E.; Stoffel, M. and Schill, W.B. (1990a). Boar sperm membrane antigens. I. Topography of a mobile glycoprotein of the sperm cell membrane. *Histochemistry* 93:485-490.

Töpfer-Petersen, E.; Friess, A.E.; Stoffel, M. and Schill, W.B. (1990b). Boar sperm membrane antigens. II. Reorganization of an integral membrane antigen during capacitation and acrosome reaction. *Histochemistry* 93:491-495.

Towbin, H.; Stachelin, T. and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 76:4350-4354.

Toyoda, Y. and 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.

Toyoda, Y.; Yokoyama, M. and Hoshi, T. (1971). Studies on the fertilization of mouse eggs in vitro. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 16:147-157.

Triana, L.R.; Babcock, D.F.; Lorton, S.P.; First, N.L. and Lardy, H.A. (1980). Acrosomal hyaluronidase follows increased membrane permeability to calcium in the presumptive capacitation sequence for spermatozoa of the bovine and other mammalian species. *Biol. Reprod.* 23:47-59.

Tung, P.S. and Fritz, I.B. (1978). Specific surface antigens on rat pachytene spermatocytes and successive classes of germinal cells. *Dev. Biol.* 64:297-315.

Tzartos, S.J. (1979). Inhibition of in-vitro fertilization of intact and denuded hamster eggs by univalent anti-sperm antibodies. *J. Reprod. Fertil.* 55:447-455.

Urch, U.A.; Wardrip, N.J. and Hedrick, J.L. (1985). Limited and specific proteolysis of the zona pellucida by acrosin. *J. Exp. Zool.* 233:479-483.

Uto, N.; Yoshimatsu, N., Lopata, A. and Yanagimachi, R. (1988). Zona-induced acrosome reaction of hamster spermatozoa. *J. Exp. Zool.* 248:113-120.

Vaidya, R.A.; Glass, R.W.; Dandekar, P. and Johnson, K. (1971). Decrease in electrophoretic mobility of rabbit spermatozoa following intra-uterine incubation. *J. Reprod. Fertil.* 24:299-301.

Van Beneden, E. (1875). La maturation de l'oeuf, la fécondation et les premières phases du développement embryonnaire des mammifères d'après des recherches faites le lapin. *Bull. Acad. Belg. Cl. Su.* 40:686.

Vanderhyden, B.C. and Armstrong, D.T. (1989). Role of cumulus cells and serum on the in vitro maturation, fertilization, and subsequent development of rat oocytes. *Biol. Reprod.* 40(4): 720-728.

Vernon, R.B.; Hamilton, M.S. and Eddy, E.M. (1985). Effects of in vivo and in vitro fertilization environments on the expression of a surface antigen on the mouse sperm tail. *Biol. Reprod.* 32:669-680.

Vernon, R.B.; Mueller, C.H.; Herr, J.C.; Feutcher, F.A. and Eddy, E.M. (1982). Epididymal secretion of a mouse sperm surface component recognized by a monoclonal antibody. *Biol. Reprod.* 26:523-535.

Vieurla, M. and Rajaniemi, H. (1980). Radioiodination of surface proteins of bull spermatozoa and their characterization by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Reprod. Fertil.* 58:483-489.

Vigil, P. (1989). Gamete membrane fusion in hamster spermatozoa with reacted equatorial segment. *Gam. Res.* 23:203-213.

Villarroya, S. and Scholler, R. (1986). Regional heterogeneity of human spermatozoa detected with monoclonal antibodies. *J. Reprod. Fertil.* 76:435-447.

Villarroya, S. and Scholler, R. (1987). Lateral diffusion of a human sperm-head antigen during incubation in a capacitation medium and induction of the acrosome reaction in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 80:545-562.

Viriyapanich, P. and Bedford, J.M. (1981). Sperm capacitation in the Fallopian tube of the hamster and its suppression by endocrine factors. *J. Exp. Zool.* 217:403-407.

Volgmayr, J.K. and Sawyer, F.R. (1986). Surface transformation of ram spermatozoa in uterus, oviduct and cauda epididymal fluids in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 78:315-325.

Volgmayr, J.K.; Fairbanks, G. and Lewis, R.G. (1983). Surface glycoprotein changes in ram spermatozoa during epididymal maturation. *Biol. Reprod.* 29:767-775.

Volgmayr, J.K. (1975). Metabolic changes in spermatozoa during epididymal transit. En: *Handbook of Physiology. Sect.7, Vol. V* D.W. Hamilton and R.O. Greep (eds.) pp.437-451. Am. Physiol. Soc., Washington, D.C.

von Baer, K. (1827). *De Ovi Mammalium et Hominis Genesi.* Leipzig.

Wassarman, P. (1983). Oogenesis: Synthetic events in the developing mammalian egg. En: *Mechanism and Control of Animal Fertilization.* J. Hartmann (ed), pp 1-54. Academic Press, New York.

Wassarman, P. (1987). The biology and chemistry of fertilization. *Science* 235:553-554.

Wassarman, P. (1988). The Mammalian Ovum. En: *The Physiology of Reproduction.* Vol 1. E. Knobil and J. Neill (eds.) pp 69-102. Raven Press, New York.

Wassarman, P.; Florman, H.M. and Greve, J.M. (1985). Receptor-Mediated Sperm-Egg Interactions in Mammals. En: *Biology of Fertilization.* Vol.2. C.B. Metz and A. Monroy (eds.), pp 341-359. Academic Press, New York.

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

Weinman, D.E. and **Williams, W.L.** (1964). Mechanism of capacitation of rabbit spermatozoa. *Nature* 203:423.

Welch, J.E. and **O'Rand, M.G.** (1985). Identification and distribution of actin in spermatogenic cells and spermatozoa of the rabbit. *Dev. Biol.* 109:411-417.

Wenstrom, J.C. and **Hamilton, D.W.** (1980). Dolichol concentration and biosynthesis in rat testis and epididymis. *Biol. Reprod.* 23:1054-1069.

Westrick, J.C.; **Boatman, D.E.** and **Bavister, B.D.** (1985). Characteristics of acrosome reaction-inducing factor from hamster cumulus and follicular fluid. *Biol. Reprod.* 32:351a.

Whitaker, M.J. and **Irvine, R.F.** (1984). Inositol 1,4,5-triphosphate microinjection activates sea urchin eggs. *Nature* 312:636-639.

White, I.G. and **Volgmayr, J.K.** (1986). ATP-induced reactivation of ram testicular, caudal epididymal and ejaculated spermatozoa extracts with Triton X-100. *Biol. Reprod.* 34:183-193.

White, J. (1983). Membrane fusion proteins of enveloped animal viruses. *Quart. Rev. Biophys.* 16:(2):151-195.

White, J. (1990). Viral and cellular membrane fusion proteins. *Ann. Rev. Physiol.* 52:675-697.

Wolf, D.E. and **Voglmayr, J.K.** (1984). Diffusion and regionalization in membranes of maturing ram spermatozoa. *J. Cell Biol.* 98:1678-1684.

Wolf, D.E. and **Ziomek, C.A.** (1983). Regionalization and lateral diffusion of membrane proteins in unfertilized and fertilized mouse eggs. *J. Cell Biol.* 96:1786-1790.

Wolf, D.E.; **Hagopian, S.S.** and **Isojima, S.** (1986). Changes in sperm plasma membrane lipid diffusibility after hyperactivation during in vitro capacitation in the mouse. *J. Cell Biol* 102:1372-1377.

Wolf, D.P. (1978). The block to sperm penetration in zona-free mouse eggs. *Dev. Biol.* 64:1-10.

Wolf, D.P. (1981). The mammalian egg's block to polyspermy. En: *Fertilization and Embryonic Development In Vitro*. L. Mastroianni and J.D. Biggers (eds.), pp 183-197. New York, Plenum Press.

Wolf, D.P. and Hamada, M. (1979). Sperm binding to the mouse egg plasmalemma. *Biol. Reprod.* 21:205-211.

Wolf, D.P.; Boldt, J.; Byrd, W. and Bechtol, K.B. (1985). Acrosomal status evaluation in human ejaculate sperm with monoclonal antibodies. *Biol. Reprod.* 32: 1157-1162.

Wolf, D.P.; Inoue, M. and Stark, R.A. (1976). Penetration of zona-free mouse ova. *Biol. Reprod.* 15:213-221.

Wolff, C. (1759). *Theoria Generationes*. Halle.

Wolgemuth, D.J. (1983). Synthetic activities of the mammalian early embryos: molecular and genetic alterations following fertilization. En: *Mechanism and Control of Animal Fertilization*. J. Hartmann (ed.), pp 415-452. Academic Press, New York.

Wong, P.Y.D. and Tsang, A.Y.F. (1982). Studies on the binding of a 32K rat epididymal protein to rat epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod.* 27:1239-1246.

Yamashita, N. (1982). Enhancement of currents through voltage gated channels in the mouse oocyte after fertilization. *J. Physiol.* 329:263-280.

Yanagimachi, R. (1969). In vitro capacitation of hamster spermatozoa by follicular fluid. *J. Reprod. Fertil.* 18:275-286.

Yanagimachi, R. (1970). The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. *J. Reprod. Fertil.* 23:193-196.

Yanagimachi, R. (1972). Fertilization of guinea pig eggs in vitro. *Anat. Rec.* 174:9-20.

Yanagimachi, R. (1977). Specificity of sperm-egg interaction. in: *Immunobiology of Gametes*. M. Edidin and M.H. Johnson (eds.), pp 255-296. Cambridge Univ. Press, London.

Yanagimachi, R. (1978a). Sperm-egg association in mammals. *Curr. Top. Dev. Biol.* 12:83-105.

Yanagimachi, R. (1978b). Calcium requirement for sperm-egg fusion in mammals. *Biol. Reprod.* 19:949-958.

Yanagimachi, R. (1981). Mechanisms of fertilization in mammals. En: *Fertilization and Embryonic Development In Vitro.* L. Mastroianni and J.D. Biggers (eds.), pp. 81-182. New York, Plenum Press.

Yanagimachi, R. (1982). Requirement of extracellular calcium ions for various stages of fertilization and fertilization-related phenomena in the hamster. *Gam. Res.* 5:323-344.

Yanagimachi, R. (1984). Zona-free hamster eggs: their use in assessing fertilizing capacity and examining chromosomes of human spermatozoa. *Gam. Res.* 10:187-232.

Yanagimachi, R. (1988a). Mammalian Fertilization. En: *The Physiology of Reproduction.* Vol 1. E. Knobil and J. Neill (eds.), pp 135-185. Raven Press, New York.

Yanagimachi, R. (1988b). Sperm-Egg Fusion. En: *Current topics in membranes and transport.* Vol. 32. F. Bronner (ed.), pp:3-43. Orlando, FL. Academic Press.

Yanagimachi, R. and Bhattacharyya. (1988). Acrosome-reacted guinea pig spermatozoa become fusion competent in the presence of extracellular potassium ions. *J. Exp. Zool.* 248:354-360.

Yanagimachi, R. and Chang, M.C. (1963). Fertilization of hamster eggs in vitro. *Nature* 200:282-282.

Yanagimachi, R. and Noda, Y.D. (1970a). Ultrastructural changes in the hamster sperm head during fertilization. *J. Ultrastruct. Res.* 31:465-485.

Yanagimachi, R. and Noda, Y.D. (1970b). Physiological changes in the post-nuclear cap region of mammalian spermatozoa: a necessary preliminary to the membrane fusion between sperm and egg cells. *J. Ultrastruct. Res.* 31:486-493.

Yanagimachi, R. and Noda, Y.D. (1970c). Fine structure of the hamster sperm head. *Am. J. Anat.* 128:367-388.

Yanagimachi, R. and Noda, Y.D. (1970d). Electron microscope studies of sperm incorporation into hamster egg. *Am. J. Anat.* 128:429-462.

Yanagimachi, R. and Phillips, D. M. (1984). The status of acrosomal caps of hamster spermatozoa immediately before fertilization in vitro. *Gam. Res.* 9:1-19.

Yanagimachi, R. and Usui, N. (1974). Calcium dependence on the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. *Exp. Cell Res.* 89:161-174.

Yanagimachi, R.; Kamiguchi, Y.; Mikamo, K.; Suzuki, F. and Yanagimachi, H. (1985). Maturation of spermatozoa in the epididymis of the chinese hamster. *Am. J. Anat.* 172:317-330.

Yanagimachi, R.; Miyashiro, L.H. and Yanagimachi, H. (1980). Reversible inhibition of sperm-egg fusion in the hamster by low pH. *Dev. Growth Diff.* 22:281-288.

Yanagimachi, R.; Noda, Y.D.; Fujimoto, M. and Nicholson, G. (1972). The distribution of negative charges on mammalian spermatozoa. *Am. J. Anat.* 135: 497-520.

Yanagimachi, R.; Yanagimachi, H. and Rogers, B.J. (1976). The use of zona-free animal ova as test system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 15:471-476.

Yang, W.H.; Lin, L.L., Wang, J.R. and Chang, M.C. (1972). Sperm penetration through the zona pellucida and perivitelline space in the hamster. *J. Exp. Zool.* 179:191-206.

Yoshimatsu, N. and Yanagimachi, R. (1988). Effects of cations and other medium components on the zona-induced acrosome reaction of hamster spermatozoa. *Develop. Growth and Differ.* 6:651-659.

Young, L.G.; Hinton, B.T. and Gould, K.G. (1985). Surface changes in chimpanzee sperm during epididymal transit. *Biol. Reprod.* 32:399-412.

Young, W.C. (1931). A study of the function of the epididymis. II. Functional changes undergone by spermatozoa during their passage through the epididymis and vas deferens in the guinea pig. *J. Exp. Biol.* 8:151-163.

Zaheb, R. and Orr, G.A. (1984). Characterization of a maturation-associated glycoprotein produced by the rat epididymis. *J. Biol. Chem.* 259:839-848.

Zernicka-Goetz, M. (1991). Spontaneous and induced activation of rat oocytes. *Mol. Reprod. and Devel.* 28:163-176.