

## Tesis de Posgrado

# Participación de residuos glicosilados en la reacción acrosomal de espermatozoides humanos

Brandelli, Adriano

1993

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

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

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

**Cita tipo APA:**

Brandelli, Adriano. (1993). Participación de residuos glicosilados en la reacción acrosomal de espermatozoides humanos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2585\\_Brandelli.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2585_Brandelli.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Brandelli, Adriano. "Participación de residuos glicosilados en la reacción acrosomal de espermatozoides humanos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1993.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2585\\_Brandelli.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2585_Brandelli.pdf)

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

**PARTICIPACIÓN DE RESÍDUOS GLICOSILADOS  
EN LA REACCIÓN ACROSOMAL  
DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS**

**Adriano Brandelli**

**Director: Dr. Jorge G. Tezón  
Co-director: Prof. Dr. Eduardo H. Charreau**

**Tesis presentada para optar al título de  
Doctor de la Universidad de Buenos Aires.**

**1993**

**INSTITUTO DE BIOLOGIA Y MEDICINA EXPERIMENTAL (IBYME)**

*Tesis  
9585  
g2*

## PREFACIO

Deseo agradecer al Dr. Jorge G. Tezón, supervisor de mi proyecto en estos años por mi formación científica, la confianza depositada al permitirme trabajar libremente en este tema de Tesis, por la aceptación de nuevas ideas, y por su orientación y sugerencias.

Quiero agradecer a las autoridades del Instituto de Biología y Medicina Experimental por la oportunidad de realizar este trabajo de Tesis, extendiendo mi agradecimiento a todos sus integrantes por el apoyo y la amistad que me brindaron.

Deseo expresar mi agradecimiento a las organizaciones que a lo largo de estos años me han mantenido financieramente. Estas han sido la Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) - Ministério de Educação de Brasil, por la beca concedida del 12/90 al 10/93; la Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) de Brasil, por el subsidio otorgado de 09/90 a 11/90; y el apoyo de la "Fundação Brandelli".

Quiero agradecer a la Dra. Helen Tortorella del Departamento de Bioquímica, UFRGS, quién me apoyó e incentivó en este emprendimiento.

Agradezco al Dr. Eduardo H. Charreau, quién fue mi co-director y consejero de estudios, cuya disposición facilitó mi integración en el IByME.

Deseo agradecer especialmente a los Dres. Lino Barañao, Patricia Cuasnicú, Leonardo Bussmann, Marta Tesone, y Omar Pignataro quienes siempre me prestaron su ayuda cuando la necesité.

Quiero agradecer también:

A la Dra. Tania D.M.Salgado del Departamento de Físico-Química, UFRGS, quien me introdujo en la investigación científica.

Al Dr. Jorge Blaquier y Claudia Sanjurjo de Fertilab, y Stella Delcourt, cuya colaboración facilitó la realización de este trabajo.

A Ricardo Damnoti y Marcelo Lamami por su colaboración con los gráficos y fotografía.

## **Sección Sentimental:**

A Patricia Miranda por las muy provechosas discusiones, por su amistad e incentivo, por su colaboración en experimentos, y por haber mantenido el bulldog siempre atado.

A M. Patricia Delcourt por su ayuda y amistad, y por haber entendido que soy "re-bueno".

A Hernan Guerrero por su gran amistad, por las cervezas compartidas y por su ayuda imprescindible en el trabajo de compaginación y edición de esta tesis.

A Guille Lanuza por su entrañable amistad, por el apoyo "grafico-logístico", y por su compañerismo en las buenas y malas horas.

A mis amigos "del fondo del pasillo", y compañeros del IByME, Debora, Paula, Silvina, Miguel, Daniela & Daniel, Lili, Vero, Guada, Saragüeta, Andrés, Alejandro Ariel, Silvia, Silvia Lugo, Pablo, Leonora, Carlos, Fabi, Esteban, Karina, por el clima de amistad y solidaridad con que me han brindado en estos años (o meses) de trabajo.

A meus grandes amigos Renato A. Konrath, Adriana F. F. Martins e Ricardo C. Michel, que desde Brasil sempre me levantaram o animo e me mantiveram a par das fofocas e lacrices do nosso querido verde, amarelo, azul e branco.

Agradezco muy especialmente a mis padres y mis hermanas, quienes siempre me apoyaron y ayudaron, cuyo constante incentivo fue fundamental para alcanzar esta meta.

**We made it, Yoggie!**

# INDICE

<b>INTRODUCCION.....</b>	<b>1</b>
<b>FERTILIZACION EN MAMIFEROS.....</b>	<b>2</b>
<b>1. EL ESPERMATOZOIDE.....</b>	<b>2</b>
1.1. Estructura.....	3
1.2. La membrana plasmática. Dominios de superficie.....	4
1.3. La Cabeza .....	5
1.4. El flagelo.....	7
<b>2. MADURACION EPIDIDIMARIA.....</b>	<b>8</b>
2.1. El epidídimo .....	8
2.2. Adquisición de capacidad fertilizante .....	9
<b>3. CAPACITACION .....</b>	<b>11</b>
3.1. Capacitación In Vivo .....	13
3.2. Capacitación in vitro.....	14
3.3. Eventos que ocurren durante la capacitación .....	15
a) Activación del sistema adenilato ciclasa/proteína quinasa .....	15
b) Cambios en la concentración intracelular de iones .....	16
c) Cambios en el metabolismo respiratorio.....	17
d) Cambios en el acrosoma.....	18
e) Cambios en el núcleo.....	18
f) Cambios en la membrana plasmática.....	18
<b>4. UNION A LA ZONA PELLUCIDA.....</b>	<b>20</b>
<b>5. REACCION ACROSOMAL .....</b>	<b>21</b>

5.1. Significado fisiológico de la reacción acrosomal.....	22
5.2. Morfología y Cinética de la Reacción Acrosomal.....	24
a) Distinción entre Reacción Acrosomal "Verdadera" y "Falsa". .....	24
b) Ensayos usados para evaluar la reacción acrosomal verdadera .....	24
c) Naturaleza exocitótica de la reacción acrosomal. ....	26
5.3. Inductores de la reacción acrosomal.....	26
5.4. Mecanismo de la reacción acrosomal.....	29
6. PASAJE A TRAVES DE LA ZONA PELLUCIDA .....	33
7. FUSION DE GAMETAS .....	34
PARTICIPACION DE CARBOHIDRATOS EN FERTILIZACION .....	36
1. CARBOHIDRATOS EN EL RECONOCIMIENTO CELULAR.....	36
2. COMPLEJIDAD DE LAS ESTRUCTURAS DE LOS CARBOHIDRATOS .....	37
3. ESTRUCTURAS DE CARBOHIDRATOS COMO SEÑAL .....	38
4. CARBOHIDRATOS EN LA INTERACCION ENTRE GAMETAS .....	39
4.1. Características de la zona pellucida.....	40
4.2. Receptores en el espermatozoide para zona pellucida.....	42
<b>MATERIALES Y METODOS .....</b>	<b>44</b>
1. OBTENCION DE LOS ESPERMATOZOIDES .....	45
2. FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR .....	46
3. EXTRACCIONES .....	47
4. SEPARACION DE FASES EN TRITON X-114.....	48

5. ACTIVIDAD ENZIMATICA.....	49
6. CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC) .....	50
7. CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD .....	52
8. ELECTROFORESIS .....	53
9. ENSAYO DE UNION A BSA-GLCNAC .....	54
10. LOCALIZACION CITOQUIMICA.....	54
11. PREPARACION DE NEOGLICOPROTEINAS.....	55
12. CAPACITACION DE LOS ESPERMATOZOIDES .....	56
13. ENSAYOS DE REACCION ACROSOMAL.....	57
a. Inducción de la reacción acrosomal .....	57
b. Ensayos de inhibición .....	58
14. ANALISIS ESTADISTICO .....	60
<b>RESULTADOS</b> .....	61
ESTUDIO DE LA $\beta$ -N-ACETILGLUCOSAMINIDASA EN ESPERMATOZOIDES	
HUMANOS. ....	62
1. EXTRACCIONES .....	62
2. CARACTERIZACION.....	65
3. PREPARACIÓN DE MEMBRANAS Y PARTICIÓN CON TRITON	
X114 .....	67
4. $\beta$ NAG DURANTE LA CAPACITACION Y LA REACCION	
ACROSOMAL .....	69
5. LOCALIZACION .....	70
6. DISCUSION .....	73
PARTICIPACION DE LA B-N-ACETILGLUCOSAMINIDASA EN LA	
REACCION ACROSOMAL DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS.....	77

1. INDUCCION DE LA REACCION ACROSOMAL POR NEOGLICOPROTEINAS.....	77
2. ESPECIFICIDAD DE LIGANDO.....	79
3. CARACTERIZACION DE LA INDUCCION DE LA RA POR NEOGLICOPROTEINAS.....	81
4. DISCUSION.....	88
 <b>DISCUSION FINAL</b> .....	 96
 <b>REFERENCIAS</b> .....	 101

## ABREVIATURAS

AMPc	3',5' fosfato cíclico de adenosina
A23187	ionóforo de calcio A23187
BSA-GlcNAc	albúmina bovina, para-aminofenil-N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina
BSA-Man	albúmina bovina, para-aminofenil- $\alpha$ -D-manopiranosido
CTx	toxina de cólera
DMSO	di-metilsulfóxido
DOC	deoxicolato de sodio
EC50	concentración efectiva media
EDTA	ácido etiléndiamino tetraacético
EGTA	ácido etilenglicol-bis( $\beta$ -aminoetil éter) tetraacético.
GMPc	3',5' fosfato cíclico de guanina
$\beta$ NAG	$\beta$ -N-acetilglucosaminidasa
NGP	neoglicoproteína
PBS	buffer fosfato salino
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PSA-FITC	lectina de <i>Pisum sativum</i> agglutinin marcada con isotiocianato de fluoresceína
PTx	toxina de Pertussis
TX100	Tritón X100
TX114	Tritón X114
VDCC	canal de calcio voltaje dependiente

# **Introducción**

# **FERTILIZACION EN MAMIFEROS**

## **1. EL ESPERMATOZOIDE**

El espermatozoide es el producto final de la espermatogénesis, proceso que ocurre en los tubos seminíferos del testículo. Este proceso involucra una serie de divisiones mitóticas de las espermatogonias, dos divisiones meióticas de los espermatocitos, extensivo remodelamiento morfológico de la espermátide durante la espermiogénesis, y liberación del espermatozoide en el lumen de los túbulos seminíferos [91].

Las estructuras especializadas del espermatozoide son un reflejo de su actividad funcional única. El acrosoma contiene enzimas esenciales para la fertilización, mientras el flagelo contiene la fuente de energía y la maquinaria necesaria para producir la motilidad espermática. La función de estos componentes es asegurar que el material genético presente en el núcleo entre al óvulo, donde la combinación de los pronúcleos haploides masculino y femenino ocurre, finalizando el proceso de fertilización y iniciando el proceso de desarrollo.

## 1.1. Estructura

El espermatozoide de mamíferos tiene dos componentes principales, la cabeza y el flagelo (Fig. 1). La cabeza consiste del núcleo, rodeado de cantidades remanentes de citoesqueleto, mínimo volumen citoplasmático y un gránulo secretorio único o acrosoma sobre su parte anterior. El núcleo del espermatozoide es haploide, conteniendo apenas uno de cada par de cromosomas, y la cromatina se torna altamente condensada durante la última parte de la espermatogénesis.

El flagelo contiene un axonema central, lo cual es un complejo de microtúbulos altamente ordenado, rodeado

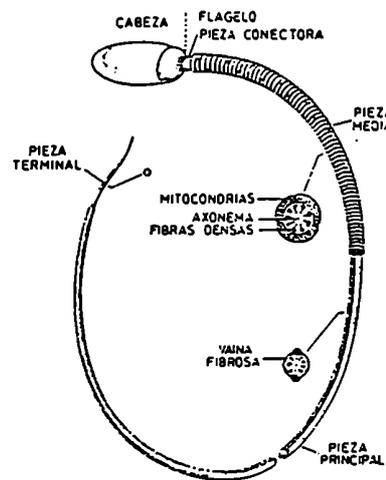


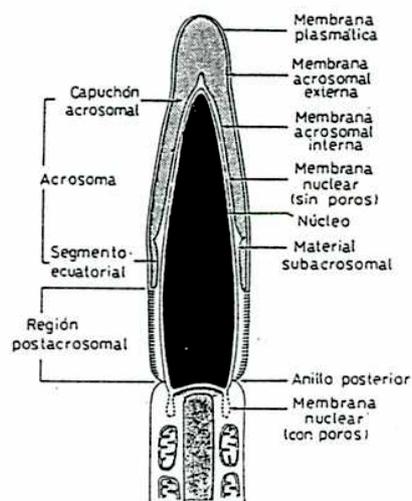
Figura 1. Esquema general de un espermatozoide de mamífero. La cabeza del espermatozoide está adherida a la pieza conectora del flagelo. Las otras regiones del flagelo son la pieza media, la pieza principal y la pieza final. La pieza media contiene la vaina mitocondrial y la pieza principal, la vaina fibrosa.

por fibras densas que se extienden de la cabeza a la parte posterior terminal del axonema. Además, la parte anterior del flagelo contiene una envoltura mitocondrial alrededor de las fibras densas y la parte posterior contiene una vaina fibrosa que recubre las fibras densas. Las fibras densas y la vaina fibrosa forma parte del citoesqueleto del flagelo. El flagelo y la cabeza están envueltas por la membrana plasmática y contienen sólo restos de citoplasma [97, 244, 347]. Aunque todos

espermatozoides de mamíferos presenten estas características generales, existen diferencias especie-específicas en el tamaño y forma de la cabeza, así como en el largo y tamaño relativo de los componentes del flagelo [16, 91, 236].

## 1.2. La membrana plasmática. Dominios de superficie

La membrana plasmática del espermatozoide esta subdividida en dominios regionales claramente delineados, que difieren en su función y composición. La naturaleza heterogénea de la superficie del espermatozoide se manifiesta a partir de estudios sobre cargas de superficie, perfiles de criofractura, unión de anticuerpos y unión de lectinas. La membrana plasmática del espermatozoide es un mosaico de dominios restringidos que reflejan las funciones especializadas de la superficie y de los componentes citoplasmáticos del espermatozoide, y como tal, varía entre diferentes regiones de su superficie [91].



**Figura 2.** Estructura de la cabeza de los espermatozoides humanos. La membrana plasmática en los dominios correspondientes al acrosoma anterior y al segmento ecuatorial rodean a la membrana acrosomal externa. La membrana acrosomal interna rodea a la envoltura nuclear. El acrosoma es más delgado en la región del segmento ecuatorial.

Lo dominios principales de la superficie de la cabeza de espermatozoides de mamíferos son: (a) el acrosoma anterior y segmento ecuatorial (acrosoma posterior) que recubren al acrosoma, y (b) la región postacrosomal que recubre la porción de la cabeza posterior al acrosoma (Fig. 2). La membrana plasmática del flagelo esta separada por el annulus en dominios que rodean la pieza media y la zona posterior. El annulus es un anillo fibroso que rodea los componentes del axonema y está firmemente unido a la membrana.

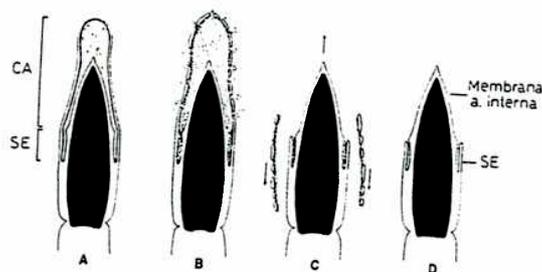
### **1.3. La Cabeza**

La cabeza de espermatozoides de mamíferos esta ocupada principalmente por el núcleo y por el acrosoma. También se encuentran componentes del citoesqueleto y una pequeña porción de citoplasma. El acrosoma se encuentra en la parte anterior final de la cabeza, por debajo de la membrana plasmática, profundamente endentado en su parte posterior por el núcleo. Los componentes del citoesqueleto se encuentran en el pequeño espacio entre las membranas acrosomal interna y nuclear, y también debajo de la membrana plasmática.

El volumen del núcleo del espermatozoide es menor que de células somáticas, y la cromatina está altamente condensada. El núcleo del espermatozoide es único tanto por la cantidad de DNA presente como por la composición de nucleoproteínas. Las dos divisiones meióticas que

ocurren durante la espermatogénesis producen un genoma haploide, con apenas uno de cada par de cromosomas presente en el núcleo.

El acrosoma se deriva del complejo de Golgi en la espermátide y contiene las enzimas necesarias para que el espermatozoide pueda, en principio, dispersar y penetrar el grupo de células del cumulus. El papel de estas enzimas en la penetración de la matriz extracelular y fusión con la membrana plasmática del ovocito es aún materia de estudio. Esta estructura de membranas se sitúa en forma de capuchón por sobre el núcleo en la porción anterior de la cabeza del espermatozoide. Sin embargo, también contiene enzimas típicas de lisosomas primarios y ha sido descrito como un lisosoma especializado, debido a que aparentemente no sirve para la función lisosomal usual. Las enzimas acrosina y hialuronidasa son únicas del acrosoma de espermatozoides de mamíferos y también son su principal componente.



**Figura 3.** Esquema de la progresión de una reacción acrosomal típica. (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. CA: capuchón acrosomal, SE: segmento ecuatorial.

La membrana acrosomal interna esta firmemente adherida a la porción anterior de la envoltura nuclear; mientras que la membrana acrosomal externa se encuentra por debajo de la membrana plasmática. El acrosoma consiste de dos segmentos, el

acrosoma anterior y el segmento ecuatorial, que se encuentran por debajo de los dominios de la membrana plasmática y que llevan el mismo nombre. Durante la reacción acrosomal, la membrana acrosomal externa se fusiona y se vesiculiza con la membrana plasmática, y la mayor parte del contenido acrosomal se libera (Fig. 3). El acrosoma es un gránulo zimógeno-secretorio cuyo contenido es descargado durante la reacción acrosomal. La membrana acrosomal interna y el segmento ecuatorial persisten hasta la fusión espermatozoide-ovocito en la mayoría de las especies [338]. El acrosoma varía en tamaño y forma en las diferentes especies, así como la distribución y prominencia de sus segmentos.

#### **1.4. El flagelo**

El flagelo del espermatozoide de mamíferos consiste de cuatro segmentos distintos: la pieza conectora (cuello), la pieza media, la pieza principal, y la pieza terminal (Fig. 1) Las características estructurales más importantes del flagelo del espermatozoide de mamíferos son el axonema, la vaina mitocondrial, las fibras densas externas, y la vaina fibrosa.

El axonema está compuesto por complejos de microtúbulos que se extienden a lo largo del flagelo. La pieza media contiene la vaina mitocondrial, mientras que la pieza principal contiene la vaina fibrosa. Las mitocondrias y la vaina fibrosa se encuentran por debajo de la membrana plasmática en la pieza media y en la pieza principal respectivamente. Las fibras densas externas se extienden desde de la

pieza conectora hasta el extremo posterior de la pieza principal y están situadas entre las mitocondrias y el axonema en la pieza media, y entre la vaina fibrosa y el axonema en la pieza principal [235, 348].

El flagelo provee la energía motriz necesaria para que el espermatozoide llegue a la superficie del ovocito y logre la fertilización. Los diferentes elementos que constituyen el flagelo están involucrados (a) en generar las ondas que producen la fuerza y (b) en propagar las ondas desde la base del flagelo hasta su punta.

## **2. MADURACION EPIDIDIMARIA**

### **2.1. El epidídimo**

El epidídimo consiste de un ducto 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, este órgano se divide en tres regiones, caput, corpus, y cauda. Sin embargo, los límites que definen estas regiones no son exactos y la función de las secciones pueden variar entre diferentes especies.

El epidídimo posee una alta capacidad para absorber y secretar fluidos. La composición química y la osmolaridad del fluido secretado por el epidídimo varía de un segmento a otro [40, 72, 144]. Existe una gran

actividad secretoria de proteínas por parte del epitelio epididimario, 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 [164, 319] e in vitro [39, 41, 48, 156, 213, 302]. Estos mismos experimentos, permitieron evidenciar que, tanto la capacidad sintética como los productos proteicos, varían de una región epididimaria a otra.

## **2.2. Adquisición de capacidad fertilizante**

Los espermatozoides de mamíferos adquieren su capacidad fertilizante durante su pasaje por el epidídimo, donde sufren cambios morfológicos y fisicoquímicos que son llamados en su conjunto maduración [8, 14, 58, 62, 92]. Estos cambios pueden ser: (a) cambios de maduración verdaderos, que son requerimientos indispensables para la fertilización; (b) cambios estabilizantes, para la protección del espermatozoide durante el transporte por los tractos reproductivos masculino y femenino y; (c) cambios por deterioro, como por ejemplo el envejecimiento.

Entre las modificaciones funcionales que han sido identificadas están: alteraciones en el metabolismo [44, 143], cambios en el patrón y efectividad de la actividad flagelar [13, 58, 211], y principalmente, la adquisición de capacidad de unión a la zona pellucida [70, 109, 110,

241, 263]. La membrana plasmática del espermatozoide sufre modificaciones durante la maduración epididimaria como cambios en cargas de superficie, unión a lectinas, fluidez de membrana, distribución de partículas intramembranas, composición de lípidos, composición de proteínas y unión de anticuerpos [91].

Los espermatozoides testiculares ya presentan antígenos específicos en su membrana plasmática. Durante la maduración epididimaria pueden ocurrir cambios debido a la adición de nuevos componentes a la superficie del espermatozoide, por modificación o enmascaramiento de componentes preexistentes, o por la pérdida de componentes de la superficie [16, 73, 92, 197, 255]. Entre las macromoléculas originadas en el epidídimo que son absorbidas y/o integradas a la membrana plasmática, las más importantes son glicoproteínas [42, 82, 165, 261]. La modificación en los residuos glicosilados de glicoproteínas preexistentes estaría mediada por glicosiltransferasas [24, 129, 131] o glicosidasas [45, 108, 122, 154, 200, 210, 312] que han sido detectadas en el fluido epididimario.

Las glicosidasas son sintetizadas y secretadas por células del epitelio epididimario [282], sugiriendo una posible acción sobre los espermatozoides epididimarios. La actividad específica de glicosidasas asociadas a membranas de espermatozoides de rata aumenta de caput a cauda [127], y entre ellas, la  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa parece estar fuertemente unida. Por otro lado, cambios en la actividad de fucosil y sialiltransferasa relacionados con la maduración de espermatozoides de rata [314] han sido reportados. La enzima galactosiltransferasa ya está

presente en la membrana plasmática de los espermatozoides testiculares de ratón [191]. Durante el tránsito por el epidídimo la secreción de un lactosaminoglicano por el epitelio epididimario enmascara e inhibe la acción de esta enzima que solo expone sus sitios en el tracto reproductivo de la hembra [156, 195, 246]. Muchos de estos cambios en la composición de carbohidratos pueden ser concretamente visualizados mediante el modificación del patrón de unión de lectinas durante la maduración epididimaria [82, 189, 197, 344].

La composición lipídica de la membrana del espermatozoide también varía durante la maduración, implicando cambios en sus propiedades físicas y químicas. Están descriptos cambios en la relación colesterol/fosfolípidos y en las concentraciones de colesterol, fosfatidilserina, etanolamina y fosofatidiletanolamina [93, 130, 223, 239, 270]. El aumento del contenido de colesterol da como resultado una disminución en la fluidez de membrana, actuando como factor estabilizante.

### **3. CAPACITACION**

Los espermatozoides de mamíferos madurados en el epidídimo y eyaculados no están listos para fertilizar ovocitos. Para poder manifestar su capacidad fertilizante, ellos necesitan pasar un cierto tiempo en el tracto genital femenino, donde sufren determinados cambios fisiológicos

(funcionales). Estos cambios, que tornan el espermatozoide capaz de fertilizar al ovocito, se denominan en conjunto capacitación [6, 7, 50, 51].

Aún hoy, 42 años después del descubrimiento de la capacitación, algunos investigadores dudan sobre la necesidad de la misma, ya que espermatozoides epididimarios o eyaculados, que jamás fueron expuestos al tracto genital femenino, son capaces de fertilizar ovocitos en un medio artificial. Si se define capacitación sólo como el fenómeno que tiene lugar en el tracto genital femenino, la duda está justificada. Sin embargo, es más apropiado considerar que el medio artificial usado para inseminar ovocitos simula la acción capacitante del tracto femenino. Si la capacitación no fuera un requisito, entonces, los espermatozoides recién eyaculados deberían ser capaces de fertilizar ovocitos inmediatamente. Sin embargo, existe un retraso entre la inseminación y el comienzo de la fertilización. Este lapso puede estar entre una y varias horas, dependiendo de la especie, y representa el tiempo aproximado que lleva la capacitación.

Es indudable que la reacción acrosomal que sigue a la capacitación es necesaria para la fertilización normal, y algunos investigadores insisten que la reacción acrosomal debe ser considerada como parte de la capacitación [50]. Otros investigadores [7, 15, 338] opinan que la capacitación y la reacción acrosomal deben ser considerados como fenómenos separados. La capacitación sería entonces la serie de cambios que hacen que el espermatozoide sea capaz de sufrir la reacción acrosomal. Mientras que la reacción acrosomal es un

fenómeno que ocurre en todas las especies, la capacitación, en cambio, es un fenómeno que solo ocurre en mamíferos y quizás en unos pocos animales que no pertenecen a esta clase. Tanto la capacitación como la maduración epididimaria de los espermatozoides de mamíferos podrían ser el resultado de la adaptación evolutiva a la fertilización interna.

### **3.1. Capacitación In Vivo**

La capacitación ocurre normalmente en el tracto genital de la hembra en estro. El sitio donde la capacitación comienza y en el que se completa puede variar dependiendo de donde se depositan los espermatozoides durante el coito. En las especies en que los espermatozoides son depositados en la vagina (conejo, humano) la capacitación puede comenzar durante el pasaje del espermatozoide por el moco cervical [176, 345]. En especies en que el semen es depositado directamente en el útero (muchos roedores y cerdo), el principal sitio de capacitación es el oviducto [147].

Se conoce muy poco sobre las condiciones y factores que controlan directamente la capacitación del espermatozoide dentro del tracto femenino. Varias sustancias han surgido como posibles candidatos, entre ellos numerosas enzimas como  $\beta$ -amilasa y  $\beta$ -glucuronidasa [125], proteinasa y neuraminidasa [155, 276], arylsulfatasa, fucosidasa y acetilhexosaminidasa [250, 251], anhidrasa carbónica [56], y esterol sulfatasa [179], glicosaminoglicanos [80, 81,

132], catecolaminas [136], taurina y hipotaurina [203]. Se necesitan mayores estudios para determinar si estas sustancias están realmente involucradas en la capacitación in vivo. Cualesquiera sean estas condiciones o factores capacitantes, no parecen ser muy específicas de la especie, ya que espermatozoides y ovocitos de una especie pueden efectivizar la fertilización en el oviducto de otra especie [83, 264].

### **3.2. Capacitación in vitro**

En 1963 surge el primer informe de que espermatozoides de mamíferos podían ser capacitados in vitro [339]. Medios Tyrode y Krebs-Ringer modificados con el agregado de fuentes de energía (glucosa, piruvato y lactato) y albúmina son comúnmente usados para capacitación in vitro. Sin embargo, no existe un medio único capaz de lograr la fertilización "in vitro" (capacitación in vitro del espermatozoide) de todas las especies. Un medio apto para las gametas de una especie no es necesariamente bueno para otra.

Las conclusiones de numerosos investigadores de que determinados reactivos bloquean la capacitación debido al hecho de que en presencia de éstos el espermatozoide no es capaz de fertilizar al ovocito deben ser tomadas con precaución. Estas conclusiones pueden o no ser ciertas, porque la capacitación no es solo un proceso que debe ocurrir en el espermatozoide para que pueda fertilizar. Para esto, el espermatozoide debe ser altamente mótil y capaz de penetrar el cumulus,

sufrir la reacción acrosomal sobre la zona pellucida, penetrarla, y fusionarse con la membrana plasmática del ovocito. Para que una fertilización in vitro sea satisfactoria se requiere una capacitación satisfactoria, pero el hecho de que no se produzca fertilización in vitro no significa que no haya ocurrido la capacitación.

Es muy común considerar la reacción acrosomal como un indicador de que la capacitación se produjo. Sin embargo, condiciones inusuales o reactivos especiales pueden inducir la reacción acrosomal en espermatozoides no capacitados y su ausencia no indica necesariamente que el espermatozoide no se haya capacitado.

### **3.3. Eventos que ocurren durante la capacitación**

#### **a) Activación del sistema adenilato ciclasa/proteína quinasa**

El sistema adenilato ciclasa y proteína quinasa dependiente de AMPc juega un importante papel tanto en la iniciación como en el mantenimiento de la motilidad [297]. Es muy probable que este sistema esté activamente involucrado en la capacitación. Existen evidencias de que la adenilato ciclasa aumente su actividad en el espermatozoide durante la capacitación [23, 31, 111, 217, 271]. El consiguiente aumento de AMPc estimula la actividad de la proteína quinasa dependiente de AMPc. Esta estimulación podría alterar la estructura terciaria y cuaternaria de la membrana del espermatozoide a través de la

fosforilación de proteínas de membrana [87, 145], con la subsecuente alteración de la permeabilidad de la membrana a distintos iones.

#### **b) Cambios en la concentración intracelular de iones**

Los espermatozoides mantienen gradientes iónicos a través de la membrana plasmática, la concentración de potasio es superior dentro de la célula que en el exterior, mientras que la concentración de sodio es superior en el exterior celular. Se cree que el gradiente iónico es mantenido por la bomba intercambiadora  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa [247, 318]. Tanto los fluidos intratubarios donde la fertilización in vivo se produce, como los medios sintéticos óptimos para la fertilización in vitro contienen elevadas concentraciones de potasio [309, 335]. Durante la capacitación se producen cambios en las concentraciones intracelulares de estos iones [149], e incrementos en la actividad de la enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa [91].

Se conoce muy poco acerca de la cinética de entrada de calcio al espermatozoide durante su capacitación. La concentración intracelular de calcio es baja debido a la presencia de una bomba  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa y un intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  presente en la membrana plasmática [38]. En el cobayo se ha reportado la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  radioactivo durante la capacitación [35, 36]. El influjo de calcio durante la capacitación también esta reportado en espermatozoides de porcino [232], ratón [260] y bovino [311]. Usando quelantes fluorescentes para la medición de calcio intracelular, no se encontró variación en la concentración intracelular de este ion en espermatozoides de conejo [198].

### c) Cambios en el metabolismo respiratorio

Existen evidencias acerca de que el espermatozoide exhibe un metabolismo aumentado (ej.: actividad glicolítica, consumo de oxígeno) luego de permanecer en el tracto genital de la hembra [32]. En muchas especies los espermatozoides exhiben un movimiento muy vigoroso, llamado hiperactivación [336], poco después de iniciada la reacción acrosomal. Durante la capacitación podrían ocurrir cambios en la membrana plasmática que hicieran más accesible la energía al aparato motor del espermatozoide.

### d) Cambios en el acrosoma

En la mayoría de las especies, no hay cambios significativos en la estructura del acrosoma durante la capacitación [15, 68, 342]. El acrosoma de espermatozoides de hámster es una excepción. Su contorno y la textura de la matrix acrosomal cambian luego de que el espermatozoide se expone a un medio capacitante [340]. La razón de esto es desconocida, pero podría deberse al influjo o eflujo de moléculas pequeñas a través de las membranas plasmática y acrosomal externa. Aún no se ha establecido si algunas enzimas acrosomales que están en su forma inactiva pasan a una forma activa durante la capacitación [120, 196].

#### e) Cambios en el núcleo

La cromatina de los espermatozoides de la mayoría de los mamíferos euterianos son estructuras muy estables debido al entrecruzamiento extensivo de proteínas nucleares por uniones disulfuro [46, 259]. Durante la capacitación, el núcleo pierde  $Zn^{2+}$  y aumenta su estabilidad [171].

#### f) Cambios en la membrana plasmática

La membrana plasmática se encuentra directamente expuesta al entorno capacitante, siendo sobre ésta que se observan los cambios más importantes durante la capacitación. Desde que se postuló por primera vez [245, 327] que la remoción o alteración de materiales que recubrían al espermatozoide constituía una parte importante del proceso de capacitación, una enorme cantidad de evidencias se acumulan a favor de este postulado [55, 234, 336].

De acuerdo con el modelo del "mosaico fluido" [281] de membranas biológicas, proteínas (o glicoproteínas) no están covalentemente asociadas con las bicapas lipídicas que forman la matriz de la membrana. Proteínas intrínsecas, que están firmemente embebidas en la bicapa, solo pueden ser removidas por tratamientos fuertes (ej.: tratamiento con detergentes), mientras que proteínas periféricamente asociadas por interacciones electrostáticas pueden ser liberadas por aumento de fuerza iónica o pH, o adición de quelantes [121]. Por lo tanto, proteínas o glicoproteínas liberadas de y/o adicionadas a la superficie del

espermatozoide durante la capacitación deben ser proteínas (o glicoproteínas) periféricas.

Los cambios que ocurren en la composición del glicocálix de la superficie del espermatozoide durante la capacitación pueden ser claramente visualizados por cambios en la capacidad de unión de lectinas [163, 296]. En humanos, por ejemplo, disminuye la unión de la lectina *Maclura pomifera* y aumenta la de Concanavalina A [67], reflejando una probable disminución de residuos galactosa y N-acetilgalactosamina y un aumento de residuos manosa y glucosa. Por otro lado, espermatozoides de carnero liberan tres diferentes proteínas glicosiladas de su superficie cuando incubados con fluido uterino [321], al mismo tiempo que otra proteína del fluido se adsorbe a su superficie.

La remoción o alteración de sustancias adsorbidas o integradas a la membrana plasmática durante la maduración epididimaria, o luego del contacto con el plasma seminal, constituye una parte muy importante de la misma [8, 55, 64, 338]. Los factores cuya remoción promovería la capacitación se denominan factores decapacitantes [234]. Muchos de estos factores decapacitantes son componentes del fluido epididimario o del plasma seminal que estabilizan la membrana plasmática del espermatozoide, controlando su permeabilidad a determinados iones, previniendo de esta manera la reacción acrosomal temprana [60, 61, 305, 331].

Incubando espermatozoides capacitados por un corto tiempo en plasma seminal, se logra la reversión del proceso a un estado de decapacitación [104]. Un cambio en la naturaleza intrínseca de la membrana plasmática, compatible con la reversibilidad de la

capacitación, es la remoción de colesterol. Se sabe que el agregado de colesterol a la membrana inhibe la capacidad fertilizante [76, 93, 117, 118], mientras que el eflujo de colesterol esta asociado a un aumento de la fertilización [98, 178, 179]. La remoción de colesterol resulta en una disminución en la relación colesterol/fosfolípidos, y consecuentemente un aumento en la fluidez de membrana [78, 332]. Es probable que la ocurrencia de una separación de fase entre los lípidos y el colesterol de membrana se constituya en un mecanismo importante para la capacitación [75, 77, 179, 338].

#### **4. UNION A LA ZONA PELLUCIDA**

Previo 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 unión, fue postulada por Gwatkin y Williams [126] quienes demostraron que la presencia de zona solubilizada de hámster prevenía la unión del espermatozoides homólogos. Se postuló entonces que la superficie del espermatozoide poseía receptores para componentes de la zona, los cuales al se incubados con dichos componentes, resultaban saturados. Posteriormente, fue demostrada la presencia de proteínas del espermatozoide con alta afinidad para otras proteínas de la zona [226, 291, 292]. 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, ZP3 y ZP2 [29, 325]. En esta especie, los espermatozoides intactos interactuarían con ZP3 (receptor primario), la cual provocaría en los espermatozoides la reacción acrosomal. Una vez reaccionados, los espermatozoides se unirían a la zona pellucida a través de la ZP2 (receptor secundario).

## **5. REACCION ACROSOMAL**

El acrosoma de espermatozoides de mamíferos es una organela rodeada por membranas que recubre la parte anterior del núcleo. Esta organela es producto del complejo de Golgi y es sintetizada y ensamblada durante la espermatogénesis [91]. El acrosoma varía considerablemente en su tamaño y forma de especie a especie, pero su estructura básica y función es la misma en todos los mamíferos euterianos [9, 97, 336].

La fusión y vesiculización de las membranas plasmática y acrosomal externa en respuesta a determinados estímulos fisiológicos o farmacológicos lleva a la liberación del contenido acrosomal al medio extracelular (ver esquema en la fig. 3), en un proceso similar a la exocitosis descrita en numerosas células. La terminación de la reacción acrosomal es un requisito absoluto para que ocurra fertilización [338].

El acrosoma puede ser considerado como un análogo de un lisosoma, y igualmente a esta organela, su interior tiene un pH ácido y

contiene una serie de enzimas hidrolíticas como la hialuronidasa,  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa, fosfatasa ácida y proacrosina [91]. Sin embargo, el acrosoma no está involucrado en procesos degradativos en el interior del espermatozoide y por otro lado, es una vesícula secretoria que libera su contenido en respuesta a estímulos específicos [112]. Por esto se lo considera más un gránulo secretorio que un lisosoma.

### **5.1. Significado fisiológico de la reacción acrosomal**

Durante su pasaje por el tracto reproductivo de la hembra, los espermatozoides sufren una serie de procesos selectivos que limitan su llegada al sitio de fertilización. Estos procesos pueden ser tanto anatómicos como ambientales, incluyendo la interacción con el moco cervical, variaciones en el entorno iónico, y secreciones del tracto reproductivo de la hembra. Los espermatozoides que llegan al ovocito todavía tienen que vencer nuevas barreras impuestas por las envolturas de la gameta femenina. Todos los ovocitos de mamíferos están recubiertos por una espesa matriz extracelular glicoprotéica, la zona pellucida. En muchas especies, la zona pellucida está recubierta por el cumulus oophorus, que consiste de las células del cumulus y su matriz compuesta principalmente por ácido hialurónico [158, 293].

Generalmente se asume que la hialuronidasa liberada del acrosoma digiere la matriz del cumulus y que la acrosina asociada sobre la superficie del espermatozoide reaccionado ayudaría en el pasaje a

través de la zona. En muchas especies, los espermatozoides que reaccionan prematuramente tienen reducido su potencial para fertilizar y no logran penetrar por el cumulus. Aquellos espermatozoides que sufren reacción acrosomal dentro de la matriz extracelular del cumulus tienen una menor capacidad para seguir penetrándola, debido a que se adhieren a las células del cumulus. Finalmente, los espermatozoides que sufren la reacción acrosomal luego de atravesar el cumulus no logran unirse a la zona pellucida. En general, espermatozoides con el acrosoma intacto pueden unirse a la zona [68, 69, 157, 225, 242, 265], aunque espermatozoides reaccionados de cobayo, conejo y ratón también se unen eficientemente [215, 219]. Con la penetración del espermatozoide se observa el desarrollo de un corte definido en la zona pellucida, presumiblemente como resultado de una digestión limitada de la matriz por parte de las proteasas asociadas al acrosoma. La contribución relativa de fuerzas mecánicas generadas por el movimiento del espermatozoide y la digestión enzimática que median el pasaje del espermatozoide a través de la zona pellucida no está clara [158].

La reacción acrosomal puede ser considerada como un proceso selectivo necesario para asegurar la llegada de espermatozoides viables y con acrosoma intacto al sitio inicial de interacción ovocito-espermatozoide, la zona pellucida. Por otro lado, la inducción de la reacción acrosomal por la zona pellucida asegura que el espermatozoide que alcanza el espacio perivitelino sea capaz de fusionarse con la membrana plasmática del ovocito.

## **5.2. Morfología y Cinética de la Reacción Acrosomal**

### **a) Distinción entre Reacción Acrosomal "Verdadera" y "Falsa".**

El acrosoma contiene una variedad de enzimas hidrolíticas, y por lo tanto puede ser "autodigerido" en espermatozoides moribundos o muertos. La membrana acrosomal externa y la membrana plasmática que la recubre pueden ser destruidas parcial o totalmente. Los espermatozoides en este estado pueden ser considerados "reaccionados" al microscopio óptico. Es importante distinguir entre las modificaciones degenerativas del acrosoma en espermatozoides muertos o moribundos (falsa) de la reacción acrosomal fisiológica que ocurre en espermatozoides móviles (verdadera).

### **b) Ensayos usados para evaluar la reacción acrosomal verdadera**

Para analizar los mecanismos moleculares involucrados en la reacción acrosomal, es necesaria una metodología que permita asegurar de forma inequívoca el estado del acrosoma.

El mejor método para asegurar el estado del acrosoma es la microscopía electrónica. Esta técnica es la única capaz de distinguir modificaciones menores del acrosoma [97]. La microscopía electrónica es un método de alto costo y complejidad. Sin embargo, los otros métodos deben ser comparados con ensayos de microscopía electrónica para asegurar su validez.

La observación directa del estado del acrosoma por microscopía óptica es posible en algunas especies que poseen acrosoma grande (hámster, ratón, cobayo), pero se complica en especies con acrosoma pequeño (humano).

Los glicoconjugados de la membrana plasmática, de la membrana acrosomal externa, o del contenido acrosomal que se pierden con la reacción acrosomal pueden ser reconocidos mediante la unión de lectinas fluoresceinadas [95, 139, 294]. Estos ensayos asociados con un tñido específico del DNA [65] permiten establecer el estado del acrosoma en espermatozoides viables.

Las tinciones histológicas son usadas en algunas especies (toro, conejo, hámster, carnero) y tienen la ventaja de que es posible distinguir espermatozoides reaccionados vivos de los muertos [85, 170, 295].

Los anticuerpos producidos contra componentes asociados a las membranas plasmática, acrosomal externa o al contenido acrosomal han sido utilizados mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta [333]. La ventaja de esta técnica es que las muestras pueden ser cuantificadas inequívocamente usando un microscopio de fluorescencia. La especificidad del anticuerpo y la localización del componente inmunoreactivo deben ser establecidos por inmunoblot y inmunolocalización por microscopía electrónica.

La sonda fluorescente clortetraciclina se ha utilizado para establecer el estado acrosomal de los espermatozoides [266]. Su uso se basa en la hidrólisis de ésteres por esterases intracelulares. Se

encontraron tres perfiles principales, caracterizados por una distribución específica de la marca en la región de la cabeza del espermatozoide.

**c) Naturaleza exocitótica de la reacción acrosomal.**

La reacción acrosomal verdadera involucra fusiones múltiples entre las membranas plasmática y acrosomal externa. Estas fusiones permiten el pasaje del contenido acrosomal a través de las membranas fenestradas. Este proceso fue claramente demostrado en espermatozoides de hámster y de conejo [12].

El sitio donde se produce la fusión entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa varía según la especie. En espermatozoides de hámster [86], carnero [101, 102] y humano [220], el sitio de fusión estaría cerca de la unión entre el acrosoma anterior y el segmento ecuatorial. Esto es consistente con el hecho de que las membranas acrosomal externa y plasmática son menos estables en esta región, que presenta también numerosos sitios de unión al calcio [326].

### **5.3. Inductores de la reacción acrosomal**

La interacción entre el espermatozoide y el ovocito constituye un excelente modelo de interacción entre células y de activación celular. Como consecuencia de esta interacción ocurren dos activaciones celulares. En primer lugar se induce la activación del espermatozoide por el ovocito (reacción acrosomal) y luego de la fusión de las membranas del

espermatozoide con las del ovocito se produce la reacción cortical y reacción de zona relacionadas con la activación del ovocito.

Se han encontrado tres sitios posibles en donde podría ocurrir la reacción acrosomal "in vivo" de espermatozoides de mamíferos: el oviducto, la matriz extracelular del cumulus oophorus, y la zona pellucida. Cuando se extraen espermatozoides de la región de la ampulla del oviducto, luego de ocurrido el apareamiento, la gran mayoría de los espermatozoides se encuentran reaccionados [71, 237, 290, 341]. Por otro lado, dentro del cumulus se encuentran espermatozoides con el acrosoma intacto, con la reacción acrosomal en curso, o reaccionados [53,71,293]. Se ha observado que los espermatozoides que se unen a la zona pellucida con su acrosoma intacto, luego de unidos comienzan a reaccionar [66,289]. Se han encontrado factores asociados con estos tres sitios que inducen la reacción acrosomal "in vitro", aunque en muchos casos los componentes no han sido identificados [114, 202, 338]. Sin embargo, compuestos como la progesterona [26, 277], prostaglandinas [202, 204-206], glicosaminoglicanos [183, 240], esteroles sulfatasa y/o factores del fluido folicular [47, 253, 268, 280, 299] pueden inducir la reacción acrosomal previo a la interacción espermatozoide-zona pellucida.

Todos estos factores son encontrados en el tracto reproductivo femenino, están a concentraciones capaces de inducir la reacción acrosomal in vitro. No se descarta la inducción simultánea por diferentes factores. Aunque inducida por factores naturales en condiciones fisiológicas, esta reacción acrosomal no estaría relacionada con la

fertilización y probablemente represente un mecanismo de selección poblacional de los espermatozoides. Solo aquellos espermatozoides que sufren la reacción acrosomal en la periferia del ovocito serán los sincronizados para la fertilización. De este modo, consideraremos reacción acrosomal fisiológica a aquella que es inducida por la zona pellucida.

Se sabe que los espermatozoides de mamíferos son capaces de sufrir la reacción acrosomal en ausencia de ovocitos o material asociado a los mismos [220, 238, 337]. Es probable 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 el proceso excitotico (ej.  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$ ), sea capaz de disparar la reacción acrosomal. De hecho, los ionóforos de calcio que igualan las concentraciones intra y extracelular de este ion, disparan la reacción acrosomal muy rápidamente (1-2 min) en los espermatozoides de todas las especies.

La velocidad de la reacción acrosomal fisiológica es probablemente dependiente de la especie, así como de las condiciones del espermatozoides y de su entorno. Se encontró que espermatozoides de hámster capacitados completan la reacción acrosomal dentro de 10 a 15 minutos de contacto con zona pellucida de hámster intacta o solubilizada, mientras que en humanos la inducción por zonas homólogas lleva 20 min [66].

#### 5.4. Mecanismo de la reacción acrosomal

El mecanismo de la reacción acrosomal esta extensivamente estudiado en invertebrados, particularmente en erizos de mar. En este sistema, los péptidos asociados con la cubierta vitelina del huevo (similar a la matriz extracelular del ovocito de mamíferos) [133], interactúan con receptores específicos en forma especie-específica [21, 74, 275]. El receptor para estos péptidos esta asociado con la enzima guanilato ciclasa [20] y como resultado de esta unión se elevan los niveles intracelulares de GMPc [21, 22]. La interacción péptido-receptor produce también quimiotaxis del espermatozoide [10, 37], aumento de su motilidad y de su metabolismo [166]. Según el modelo presentado por Shapiro y col.[54, 159, 269, 272], la interacción peptido-receptor desencadena dos vías paralelas. Una de ellas,  $\text{Ca}^{2+}$ -independiente, llevando a un aumento del pH intracelular por influjo de  $\text{Na}^+$  y eflujo de  $\text{H}^+$ . La otra es una despolarización de membrana en un proceso  $\text{Ca}^{2+}$ -dependiente. Las dos vías llevan a la apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , resultando en el influjo masivo de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, activación de fosfolipasas, producción de lípidos fusogénicos, fusión de las membranas plasmática y acrosomal externa, y exocitosis del contenido acrosomal.

Nucleótidos cíclicos, calcio y bicarbonato también están interrelacionados en el mecanismo de la reacción acrosomal [115,150,320], sin embargo la regulación de este sistema todavía no esta elucidada. La enzima adenilato ciclasa del espermatozoide es activable

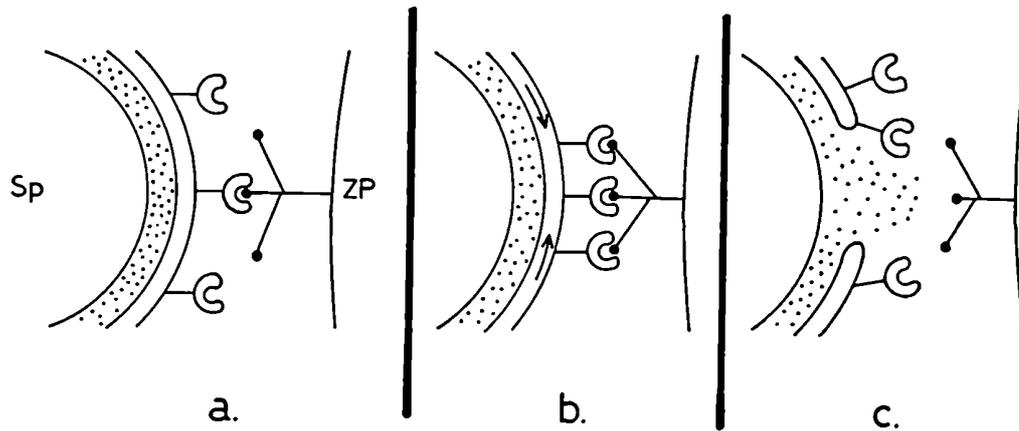
directamente por bicarbonato [116, 230, 288], y se ha demostrado que espermatozoides de porcino presentan sistemas de transporte de calcio y bicarbonato [231]. Por otro lado, con el uso de bloqueantes de canales aniónicos se logro inhibir reacción acrosomal en cobayo [148] y estudios de nuestro laboratorio demuestran que el calcio necesita la presencia de bicarbonato para su conocida capacidad de inducir la reacción acrosomal.

La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  es un paso esencial en el mecanismo de reacción acrosomal de espermatozoides de mamíferos [342]. Sin embargo, la entrada de calcio por si sola no es suficiente para desencadenar todo el proceso. Es 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 encuentre directa o indirectamente involucrados en este proceso.

Como la excitosis que sufre una célula somática, la reacción acrosomal puede ser inducida por condiciones que causen un aumento brusco en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Es biológicamente conveniente que la reacción acrosomal ocurra en la cercanía del ovocito, por lo tanto, el espermatozoide debe tener una larga vida útil para permanecer íntegro durante el transporte en el tracto femenino. El mantenimiento de altas concentraciones intracelulares de  $\text{K}^+$  y bajas de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$  resultaría importante para la sobrevivencia del espermatozoide y evitaría la ocurrencia de reacciones acrosomales tempranas. Estos gradientes iónicos se mantendrían debido a la existencia de bombas

$\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa y  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa en la membrana. Durante la capacitación, la remoción y alteración de componentes macromoleculares adsorbidos a la superficie celular resultaría en la exposición de ciertas proteínas integrales de membrana, incluyendo posibles receptores para la zona pellucida [336]. Un caso bien definido es la liberación de un lactosaminoglicano del fluido epididimario, que se une a la galactosiltransferasa de espermatozoides de ratón y inhibe la unión entre las gametas [195]. El aumento en la fluidez de membrana facilitaría el agrupamiento de receptores para la zona pellucida, que ha sido postulado como mecanismo de inducción de la exocitosis acrosomal [187, 209].

La señal para la iniciación de la reacción acrosomal debe ser recibida por receptores presentes en la membrana plasmática, los cuales transmiten dicha señal a través de esta membrana. Los espermatozoides de mamíferos poseen proteínas G que son ADP-ribosiladas por toxina de Pertussis [19, 168], y aparentemente tienen un papel importante en la exocitosis acrosomal inducida por zona pellucida [167]. El tratamiento de espermatozoides de ratón [94], bovinos [105], o humanos [182] con esta toxina lleva a la inhibición de la reacción acrosomal inducida por zona. Las evidencias presentadas en estos trabajos estarían indicando que la toxina de Pertussis actuaría previamente al incremento en las concentraciones intracelulares de calcio y elevación del pH que median la reacción acrosomal. En otras palabras, la ocupación de un receptor para glicoproteínas de la zona pellucida podría estar conectada con estos dos eventos a través de una proteína G. Por otro lado, la activación de



**Figura 4.** Esquema de la reacción acrosomal inducida por agregamiento de receptores para la zona pellucida. El reconocimiento y unión entre sitios específicos del espermatozoide para oligosacáridos de la zona pellucida (a), causa el agregamiento de estos receptores (b), que desencadena la reacción acrosomal (c).

canales de calcio voltaje dependientes ha sido reportada como necesaria en esta vía de transducción de señales y aparentemente actuaría a posteriori de la activación de la proteína G [103].

El agregamiento de receptores en respuesta a un estímulo biológico ha sido descrito como un importante mecanismo para iniciar la transducción de señales a través de la membrana [84, 151, 181, 224]. La unión con glicoproteínas de la zona pellucida causaría el agregamiento de los receptores del espermatozoide, desencadenando de esta manera la exocitosis acrosomal inducida por zona [187, 194] (Fig. 4). La necesidad de agrupamiento de los receptores para la actividad biológica ha sido descrita para receptores de factores de crecimiento [84, 224]. La búsqueda de otras analogías entre estos receptores y los de zona pellucida llevaron a Saling y col. [185, 186] a encontrar que en el

ratón, proteínas fosforilables en tirosina (característico de receptores de EGF) serían las moléculas receptoras para la glicoproteína ZP3.

Resumiendo, la glicoproteína ZP3 induce la reacción acrosomal y puede representar la señal que ocurriría por la unión del espermatozoide a la zona pellucida, agregando los receptores sobre la superficie del espermatozoide. La activación de los receptores facilitaría la difusión de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, posiblemente por activar canales de calcio voltaje-dependiente. El influjo masivo de  $\text{Ca}^{2+}$  inactivaría la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa, resultando en un rápido aumento de  $\text{Na}^+$  intracelular, causando un eflujo de  $\text{H}^+$  (a través del  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter), resultando en el aumento del pH intracelular. El  $\text{Ca}^{2+}$  facilita la fusión de las membranas por unión a los fosfolípidos aniónicos, induciendo la separación de fase de membrana de fosfolípidos. Además, el  $\text{Ca}^{2+}$  activa fosfolipasas que atacan los fosfolípidos generando productos fusogénicos. El aumento del pH intracelular causa la conversión de proacrosina en acrosina enzimáticamente activa que dispersa la matriz acrosomal que contiene otras enzimas.

## **6. PASAJE A TRAVÉS DE LA ZONA PELLUCIDA**

El espermatozoide debe estar completamente reaccionado antes de penetrar la zona pellucida [9, 15, 211]. Durante su pasaje a través de la zona, el espermatozoide reaccionado pierde todos sus componentes, excepto el segmento ecuatorial y la membrana acrosomal interna.

Aparentemente, un intenso movimiento del flagelo es esencial para que la penetración sea efectiva [113].

Existen dos hipótesis para el mecanismo de penetración de la zona [146, 214, 293]. La primera hipótesis considera que la penetración es puramente mecánica, donde las enzimas acrosomales estarían únicamente involucradas en iniciar y facilitar la reacción acrosomal. En contraste, la segunda hipótesis defiende la participación de enzimas en este proceso. En este caso, la hialuronidasa de superficie y/o hialuronidasa liberada durante el pasaje a través del cumulus facilitaría este paso. Otras enzimas en la superficie del espermatozoide mediarían la adhesión a la zona pellucida [262, 278]. Las hidrolasas acrosomales serían liberadas en la superficie de la zona, empezando la digestión de esta matriz. Un pool de acrosina, y posiblemente de otras enzimas acrosomales, permanecen unidas a la membrana acrosomal interna y continúan la perforación de la zona [5, 89, 96, 285].

## **7. FUSION DE GAMETAS**

Una vez que los espermatozoides atraviesan la zona pellucida, la cabeza cruza el espacio perivitelino, se sujeta a la membrana plasmática del ovocito y, finalmente, es gradualmente incorporado al citoplasma del mismo. Estudios 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 [113, 202]. Esta región solo adquiere capacidad de fusionarse con el oolema una vez que el espermatozoide ha sufrido la reacción acrosomal . Los espermatozoides intactos, independientemente de que se encuentren capacitados o no, aun puestos en contacto directo con el oolema, no son capaces de fusionarse al mismo [336].

# **PARTICIPACION DE CARBOHIDRATOS EN FERTILIZACION**

## **1. CARBOHIDRATOS EN EL RECONOCIMIENTO CELULAR**

El reconocimiento es un evento central en varios fenómenos biológicos de interacción celular, tales como fertilización, embriogénesis, migración celular, defensa inmune, infección microbiana, y formación de órganos. En general se acepta que las células se reconocen unas a otras a través de estructuras complementarias presentes en sus superficies: una estructura en una célula determinada lleva información biológica que puede ser reconocida por una estructura de otra célula. Los espermatozoides, por ejemplo, pueden distinguir ovocitos de su propia especie de ovocitos de otras especies, y unirse únicamente con los suyos. Por otro lado, mientras algunas bacterias eligen preferentemente los tractos intestinal o urinario; otras eligen diferentes órganos.

La base química de muchos fenómenos de reconocimiento celular es desconocida. Las proteínas, que son mediadoras de la mayoría de las reacciones químicas en las células, están presentes en la superficie celular y ciertamente están involucradas en el reconocimiento. Sin embargo, se acumulan evidencias que sugieren que en muchos casos los carbohidratos cumplen un papel fundamental en el reconocimiento celular [274, 298, 328, 330, 349].

## **2. COMPLEJIDAD DE LAS ESTRUCTURAS DE LOS CARBOHIDRATOS**

En contraste con los péptidos y oligonucleótidos, donde la información contenida viene dada solamente por el número de unidades monoméricas y su secuencia, en los carbohidratos la información también esta dada por la posición y configuración anomérica ( $\alpha$  o  $\beta$ ) de las unidades glicosídicas. Dos monosacáridos idénticos pueden unirse para formar once disacáridos diferentes, mientras que dos aminoácidos pueden formar un único dipéptido. Cuatro nucleótidos diferentes pueden formar apenas 24 tetranucleótidos distintos, pero cuatro monosacáridos diferentes pueden formar 35.560 tetrasacáridos únicos. Además, puede ocurrir mayor diversificación estructural por unión covalente de sulfato, fosfato y grupos acetyl a los azúcares [249, 273].

Este potencial de diversidad estructural es el "dolor de cabeza" de la química de carbohidratos, pero es una conveniencia para las células que pueden construir polisacáridos altamente efectivos como portadores de información. Existe una gran diversidad de estructuras de carbohidratos asociadas con glicoconjugados solubles y de superficie celular. Esta diversidad tiene importante significado biológico, ya que en muchos casos los carbohidratos modifican la actividad de proteínas a las cuales están unidos, o sirven como marcadores de diferenciación celular, desarrollo, y estados patológicos.

### **3. ESTRUCTURAS DE CARBOHIDRATOS COMO SEÑAL**

Para que estructuras de carbohidratos sirvan como señal, se debe esperar que, (1) exista una diversidad de estructuras que sirva como marcadores específicos en células específicas; (2) lectinas, o proteínas de unión a carbohidratos deben ser capaces de reconocer y discriminar entre las distintas estructuras; y (3) estructuras únicas deben estar en diferentes células [233].

Como ya se comentó en la sección anterior, una gran diversidad de oligosacáridos puede ser generada usando varias combinaciones de unos pocos monosacáridos. Por otro lado, las lectinas (una clase de proteínas que pueden unirse con azúcares rápida, selectiva y reversiblemente) aparecen con frecuencia en la superficie celular, donde están estratégicamente posicionadas para asociarse con carbohidratos de células vecinas. Las lectinas presentan una elevada especificidad: además de distinguir entre diferentes monosacáridos, también lo hacen para distintos oligosacáridos [184, 273].

Todas las células poseen una "cubierta" de azúcares o glicocálix, que consiste en su mayoría de glicoproteínas y glicolípidos asociados a la membrana. Muchas estructuras de glicoproteínas y glicolípidos han sido identificadas, y tal diversidad es de hecho significativa. Además, ocurren cambios característicos en estas estructuras durante el desarrollo, diferenciación y enfermedad de la célula. La disposición de carbohidratos

en células cancerosas es claramente diferente de la observada en células normales [274]. Un ejemplo de un carbohidrato único encontrado en glicoproteínas con localización celular específica es la manosa-6-fosfato en las hidrolasas ácidas lisosomales por medio del cual estas enzimas se unen a receptores específicos [169].

#### **4. CARBOHIDRATOS EN LA INTERACCION ENTRE GAMETAS**

La fertilización se constituye en un sistema único para el estudio de carbohidratos en el reconocimiento celular. Los carbohidratos están implicados en el reconocimiento espermatozoide-ovocito en vertebrados y invertebrados. Mientras que los eventos del proceso de fertilización difieren entre especies, la capacidad del espermatozoide para reconocer glicoconjugados de la cubierta extracelular del ovocito parece ser una constante. En erizos de mar, un glicoconjugado de fucosa sulfatada de la cubierta vitelina del ovocito induce la exocitosis acrosomal en espermatozoides homólogos [142].

En muchas especies, la capacitación es estimulada por glicosaminoglicanos, tales como la heparina [240]. Por otro lado, el contenido acrosomal de espermatozoides capacitados es liberado por exocitosis en respuesta a la unión a glicoproteínas de la zona pellucida [28]. Glicosiltransferasas y glicosidasas presentes en la superficie del

espermatozoide son sugeridas como proteínas de unión a estructuras de carbohidratos de la zona [49, 119, 278, 317].

#### **4.1. Características de la zona pellucida**

La zona pellucida esta compuesta por glicoproteínas sulfatadas, probablemente en sus oligosacáridos, que son únicas de esta matriz extracelular y están organizadas vía interacciones no covalentes formando una estructura repetitiva de filamentos entrecruzados [323]. La matriz extracelular ZP cuenta de un pequeño número de diferentes glicoproteínas, las cuales fueron identificadas para diferentes especies. La zona porcina, por ejemplo, tiene cuatro familias distintas: ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 con respectivos pesos moleculares de 82, 61, 55 y 21 kDa. Por otro lado, la zona pellucida de ratón tiene tres: ZP1 (200 kDa), ZP2 (120 kDa) y ZP3 (83 kDa) (27, 323). ZP2 y ZP3 están presentes en cantidades equimolares, mientras que ZP1 está presente en menores cantidades. ZP1, ZP2 y ZP3 contienen oligosacáridos complejos unidos por uniones del tipo N-glicosídicas. ZP2 y ZP3 también presentan uniones del tipo O-glicosídica, algunos de estos oligosacáridos están involucrados en la interacción espermatozoide-ovocito [28, 30].

La glicoproteína sulfatada ZP3 de 83 kDa consiste de un polipéptido de 44 kDa a lo cual se unen 3 o 4 cadenas de oligosacáridos N-glicosídicas y varias cadenas O-glicosídicas [267]. Por lo tanto, aproximadamente 50% de la masa de la molécula es dada por

carbohidratos. En porcino, los oligosacáridos están distribuidos en dominios delimitados y no dispersos a lo largo del polipéptido de ZP3 [346]. Por otro lado, la digestión de  $^{125}\text{I}$ -ZP3 de ratón con papaína y proteasa V8 y posterior fraccionamiento de glicopéptidos, mostró que el péptido mas altamente glicosilado presentaba actividad de unión a espermatozoides homólogos [256]. La glicosilación de ZP parece ser un determinante esencial para la actividad biológica [28, 106].

Están reportadas diferencias en cuanto a la composición aminoacídica, composición de oligosacáridos, mapas de glicopéptidos, precursores biosintéticos, reactividad inmunológica y funciones biológicas para la tres glicoproteínas de la zona pellúcida [4, 324]. Además, existen evidencias que sugieren que estas glicoproteínas no están relacionadas con componentes de varios tipos de matriz extracelular (ej.: laminina, fibronectina, colágeno IV, entactina y heparina sulfato) [88, 323]. Por lo tanto, las glicoproteínas de la ZP representan una clase única de componentes extracelulares.

Se requiere que las glicoproteínas de la ZP posean dominios involucrados en el ensamblado y mantenimiento de la estructura de cubierta insoluble (dominios estructurales), así como dominios involucrados en la interacción espermatozoide-ovocito durante la fertilización (dominios funcionales).

#### **4.2. Receptores en el espermatozoide para zona pellucida.**

Se postula que proteínas de la membrana plasmática del espermatozoide tendrían la actividad de receptor para oligosacáridos de la zona pellucida [28, 162, 195, 207]. Proteínas con capacidad de unión a fucosa han sido postuladas en porcino [306, 308]. Otros investigadores sugieren que proteínas con actividad de glicosiltransferasa [49, 99, 208, 209] o proteasa [307, 310] podrían ser los receptores para la zona. La  $\beta$ -1,4-galactosiltransferasa esta presente en la membrana plasmática de espermatozoides de ratón [279], bovino y equino [99], en una forma distinta de la tradicional encontrada en el compartimiento de Golgi [192]. En el ratón se ha demostrado que la unión espermatozoide-ovocito esta mediada por oligosacáridos de la glicoproteína ZP3 [106] que son reconocidos por la proteína  $\beta$ -1,4-galactosiltransferasa del espermatozoide [209]. También se postulan glicosidasas como la  $\alpha$ -manosidasa y la N-acetilglucosaminidasa. La  $\alpha$ -manosidasa fue identificada en espermatozoides de rata [316], y luego en humanos [317] y ratón [59]. En el ratón, inhibidores de esta enzima bloquean la interacción espermatozoide-ovocito [59]. La N-acetilglucosaminidasa esta presente en la superficie de los espermatozoides de ascidias y es responsable por la unión con la cubierta vitelina de ovocitos homólogos [119].

Sin embargo, algunos investigadores sostienen que residuos glicosilados de glicoproteínas del espermatozoide tendrían a su vez receptores proteicos en la zona pellucida [1, 2, 175, 177].

En ratón, existen evidencias de que oligosacáridos con residuos  $\alpha$ -galactosa terminales en la zona pellucida son necesarios para la el reconocimiento del espermatozoide [30]. Residuos terminales N-acetilglucosamina también son requeridos para la interacción entre espermatozoide y ovocito [278]. Sin embargo, en la mayoría de los casos, los carbohidratos y la proteínas complementarias no están identificados.

En este trabajo, se estudió la participación de carbohidratos sobre un parámetro funcional del espermatozoide: la reacción acrosomal. Utilizando distintos residuos glicosídicos unidos a una macromolécula (albúmina sérica bovina), se trató de simular el efecto de la zona pellucida, permitiendo con esto estimar cuales residuos son los determinantes o mas importantes en el reconocimiento entre espermatozoide-ovocito. Por otro lado, se caracterizó la  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa de espermatozoides humanos, visto que habían evidencias de que podría ser la molécula receptora para los residuos N-acetilglucosamina de los oligosacáridos de la zona pellucida.

# **Materiales y Métodos**

---

---

# MATERIALES Y METODOS:

## 1. OBTENCION DE LOS ESPERMATOZOIDES

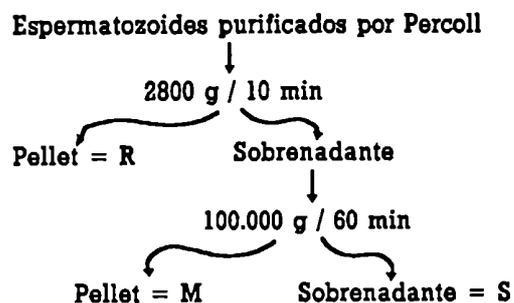
Las muestras de semen fueron obtenidas de individuos normospérmicos, según las normas de la Organización Mundial de la Salud (O.M.S.) [334]. Luego de la completa licuefacción, se purificaron los espermatozoides por centrifugación en colchón de Percoll. Para esto, aproximadamente 500  $\mu$ l de semen fueron depositados sobre 700  $\mu$ l de Percoll 50% en medio de cultivo BWW [25]. Se centrifuga por 10 minutos a 1000 g. Los espermatozoides viables fueron sacados del fondo utilizándose una micropipeta, y luego lavados por dos centrifugaciones sucesivas en BWW. La composición del medio BWW está dada en la tabla 1.

Tabla 1. Composición del medio BWW.

Componente	mM	g/l
NaCl	94.5	5.52
KCl	4.8	0.356
Lactato de Calcio	4.3	0.47
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.2	0.16
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1.2	0.292
Glucosa	5.5	1.0
Penicilina		0.08
Streptomycina		0.05
Piruvato de Sodio	0.3	0.028
Lactato de Sodio	1.9	0.36 ml
NaHCO <sub>3</sub>	25.0	2.1
Albúmina sérica bovina	1.0	

## 2. FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR:

Los espermatozoides obtenidos como se ha descrito anteriormente fueron resuspendidos en Tris 50 mM pH 7,4, 75 mM sacarosa, 6 mM  $MgCl_2$ , 1 mM benzamidina, 2 mM EDTA, 5  $\mu\text{g/ml}$  Pestatin A, 10  $\mu\text{g/ml}$  Leupeptin, 1  $\mu\text{g/ml}$  Bestatin, y luego sonicados 5-10 seg (4x) en baño de hielo. Núcleos y células intactas fueron removidos por centrifugación 10 min a 2800 g (residuo, R), y las membranas fueron separadas por centrifugación a 100.000 g por 60 min. (membranas, M).



**Figura 5.** Esquema de fraccionamiento subcelular de espermatozoides humanos .

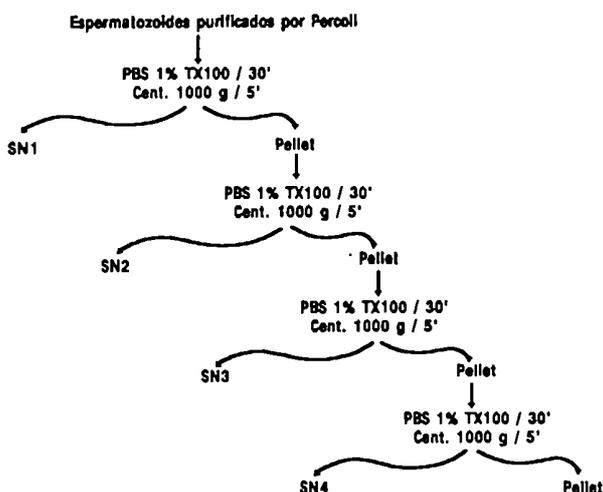
El sobrenadante de 100.000 g contiene la fracción soluble (soluble, S). El siguiente procedimiento también fue utilizado para obtener membranas: el sobrenadante de 2800 g fue sembrado sobre un gradiente de 1,3/1,7 M sacarosa y centrifugado 60 min a 100.000 g. Membranas purificadas fueron

recogidas de la interface 1,3/1,7 M. Ver esquema del fraccionamiento subcelular en la figura 5.

### 3. EXTRACCIONES:

Los espermatozoides fueron sometidos a extracciones en diferentes medios. Para ello, se incubaron  $2 \times 10^6$  espermatozoides en 1 ml de alguno de los siguientes medios: BWB; PBS (8.5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 150 mM NaCl); NaCl 0,6M; PBS 1% Tritón X100; o PBS 0,1% deoxicolato de sodio; por 30 minutos a temperatura ambiente y con agitación suave. Luego se centrifugó a 1000 g y se midió actividad enzimática de  $\beta\text{NAG}$  en pellet y sobrenadante. Se determinó actividad total en una alícuota de espermatozoides incubados con 1% TX100.

Por otro lado, se hicieron extracciones secuenciales en PBS 1% Tritón X100. En este caso,  $20 \times 10^6$  células fueron incubadas en PBS-TX100 por 30 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Se separaron pellet y SN por centrifugación y se repitió la extracción con el pellet 3 veces (Ver esquema en la fig. 6). Se ensayó actividad de  $\beta\text{NAG}$  con el pellet final y sobrenadantes.



**Figura 6.** Esquema de las extracciones secuenciales con Tritón X-100.

Para estudiar el efecto de diferentes agentes en la disociación de la  $\beta\text{NAG}$ , se utilizaron diferentes buffers en la cuarta extracción. Con este objetivo, el pH fue ajustado en 2.5, 5.0 o 10.0. En otros experimentos, se agregó 1 M

KCl, 150 mM NaSCN o  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ . En todos casos el buffer de extracción contenía 1% TX100 o 0,1% DOC.

Para estudiar el efecto de citocalasina B o colchicina, los espermatozoides fueron sometidos a extracción en presencia de 10 o 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de estos agentes. Dado que éstos están disueltos 1 mg/ml en dimetilsulfóxido (DMSO), una cantidad equivalente de DMSO fue usada como control. Para investigar el efecto de estos agentes sobre espermatozoides capacitados,  $5 \times 10^6$  células/ml fueron incubadas 18 hs a  $37^\circ\text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$ , en medio con 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  citocalasina B o colchicina.

#### **4. SEPARACION DE FASES EN TRITON X-114**

El procedimiento descrito es una modificación del método de Hooper & Bashir [140], cuyo esquema se muestra en la figura 7. Membranas de espermatozoide, obtenidas como se ha descrito anteriormente, fueron resuspendidas en 10 mM Tris pH 7.4, 200 mM NaCl. Se agregó TX114 hasta una concentración final de 2% (v/v), se mezcló por agitación en vortex y luego se incubó por 5 min a  $4^\circ\text{C}$ . Se centrifugó la muestra a 9000 g por 10 min a  $4^\circ\text{C}$  en rotor de ángulo fijo. El pellet insoluble en detergente (DI) fue lavado y resuspendido en 10 mM Tris, 200 mM NaCl. El sobrenadante fue sembrado sobre 175 mM sacarosa, 10 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.06% TX114, incubado 5 min a  $30^\circ\text{C}$  y luego centrifugado a 2100 g por 5 min en rotor swing-out. Se transfirió la fase superior (acuosa) a otro tubo, se adicionó TX114

hasta una concentración final de 0.5% (v/v) y se repitió el procedimiento usando el mismo colchón de sacarosa. La fase acuosa resultante fue nuevamente transferida a otro tubo y se agregó TX114 para concentración final de 2% (v/v). La muestra fue mezclada, incubada 5 min a 4°C, 5 min a 30°C y luego centrifugada a 2100 g por 5 min. El sobrenadante final (fase acuosa, AP) fue removida.

La fase rica en detergente fue obtenida luego de la remoción del colchón de sacarosa y dilución en 10 mM Tris pH 7.4, 200 mM NaCl.

## 5. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Se determinó actividad de  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa usando el sustrato fluorogénico específico 4-metilumbeliferil-N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina [180]. Para los ensayos se incubó a 37°C 50  $\mu$ l de la muestra con 100  $\mu$ l de buffer citrato 0.25 M pH 4.5 y 100  $\mu$ l de 0.8 mM sustrato. La reacción se paró por adición de 1 ml Glicina 0.5 M pH 10.0.

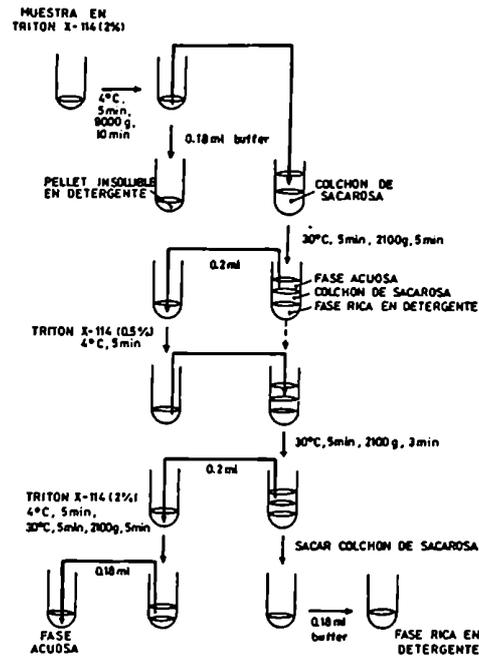
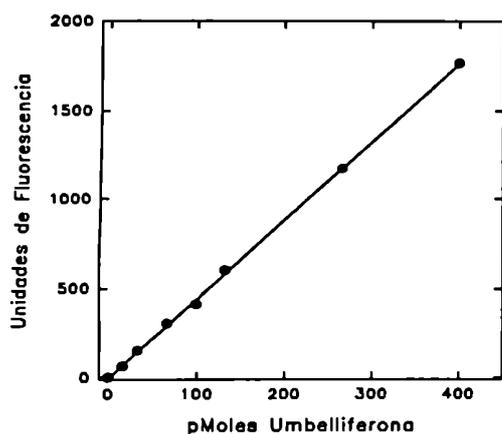


Figura 7. Esquema de la separación de fases con Tritón X-114.



**Figura 8.** Curva de calibración del fluorímetro. Construida con diferentes concentraciones de umbeliferona en glicina 0,5 M pH 10,0.

La actividad se expresa como unidades de enzima: una unidad corresponde a 1  $\mu\text{mol}$  de producto por minuto, que se determina por interpolación en la curva de calibración (Fig. 8). Para calcular actividades específicas, la concentración de proteínas fue determinada según Lowry y col. [193].

## 6. CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC)

Los espermatozoides obtenidos como se ha descrito anteriormente fueron resuspendidos en 100 mM fosfato pH 7.0, 0,1% deoxicolato de sodio, 0.1 mM Benzamidina, 2 mM EDTA, 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Bestatin, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Leupeptin, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Pepstatin A y 0.2 mM PMSF. Se homogeneizó la suspensión por agitación en vortex, se incubó por 10 min a 4°C y se centrifugó a 7500 g. El sobrenadante fue dializado contra el buffer de siembra. Las condiciones de corrida para cada columna están especificadas en la página siguiente.

**a. Superose 12 HR 10/30**

Volumen del lecho: 64 ml.

Siembra: 400 µl de muestra dializada contra PBS.

Flujo: 0,4 ml/min

Eluyente: PBS

AUFS: 0,01

Presión: 20 bar

**b. Mono Q HR 5/5**

Volumen del lecho: 2,7 ml.

Siembra: 1 ml de muestra dializada contra 10 mM fosfato pH 7,0.

Flujo: 1 ml/min

Eluyentes: A. 10 mM fosfato pH 7.0

B. 10 mM fosfato pH 7.0, 1 M NaCl.

AUFS: 0,01

Presión: 23 bar

Gradiente:	0-5 min	0 % B
	5-65 min	0-30 % B
	65-95 min	30-100 % B
	95-105 min	100 % B.

**c. TSK Phenyl 5-PW**

Volumen del lecho: 9,0 ml.

Siembra: 500  $\mu$ l de muestra dializada contra 100 mM fosfato pH 7.0, 1 M sulfato de amonio.

Flujo: 0.5 ml/min

Eluyentes: A. 100 mM fosfato pH 7.0, 1 M sulfato de amonio

B. 100 mM fosfato pH 7.0

C. H<sub>2</sub>O.

AUFS: 0,005

Presión: 16 bar

Gradiente:	0-20 min	0 % B
	20-80 min	0-100 % B
	80-100 min	100 % B
	100-120 min	100 % C

Se ensayó actividad de  $\beta$ NAG en las fracciones de cada columna.

**7. CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD**

Los extractos de espermatozoides fueron obtenidos como se ha descrito en la sección anterior.

**a. Concanavalina-A Sepharose 4B:** se sembró la muestra dializada contra 20 mM Tris pH 7.5, 1M NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub> y 0.2 mM PMSF en una columna de 1,5 x 1,5 cm. Luego de la siembra, se lavó la columna con 6 ml de buffer de siembra y se eluyó con 6 ml de 100 mM  $\alpha$ -metil-D-manopiranosido seguido por 6 ml de 500 mM  $\alpha$ -metil-D-manopiranosido en el mismo buffer. Las fracciones fueron ensayadas para actividad de  $\beta$ NAG y unión a BSA-GlcNAc.

**b. Cibacron Blue Sepharose:** se sembró la muestra dializada contra PBS 0.2 mM PMSF en una columna de 0,7 x 1.3 cm. Se lavó la columna con 4 ml de PBS y se eluyó con 6 ml de 10 mM fosfato pH 7.4, 1M NaCl seguido por 10 mM fosfato 1,4 M NaCl. Las fracciones fueron ensayadas para actividad de  $\beta$ NAG y unión a BSA-GlcNAc.

## 8. ELECTROFORESIS

Extractos de espermatozoides fueron procesados por electroforesis en geles de poliacrilamida 6.5% no desnaturalizantes (80 x 60 mm, 1,5 mm de espesor) [128]. Las corridas electroforéticas se realizaron en una unidad Mighty Small II (Hoefer Scientific Co.) a 20mA/gel y 4°C. Luego de la electroforesis, los geles fueron incubados 15 min en 250 mM citrato pH 4.5 a 4°C. Cada calle fue cortada en trozos de 0,25 cm, los cuales fueron transferidos a tubos de vidrio conteniendo 100  $\mu$ l de buffer citrato. La actividad enzimática fue ensayada con la adición de 100  $\mu$ l de solución de sustrato, como se ha descrito anteriormente.

## **9. ENSAYO DE UNION A BSA-GlcNAc**

Las fracciones de las cromatografías de afinidad fueron inmovilizadas en placas de poliestireno (100  $\mu$ l/well, 24 hs, 4°C). Se bloqueó con PBS 1 mg/ml BSA 0,02% Tween 20 (buffer de boqueo, BB) a temperatura ambiente por 60 min. La marcación de la NGP con sulfosuccinimidil 6-(biotinimido) hexanoato (NHS-LC-biotina) se llevó a cabo según procedimientos standard [135]. BSA-GlcNAc biotinilada (1mg/ml) fue diluida 100 veces en PBS, se agregó a las placas y se incubó por 2 hs a temperatura ambiente. Se detectaron los complejos con avidina-peroxidasa. Los lavados entre incubaciones se realizaron con PBS 0,02% Tween 20. 2,2'azino-bis(3-etilbenzotiazoline sulfonato) 0.1 mg/ml. Se usó 0.005% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en 50 mM citrato, pH 5.3 como sustrato. Se paro la reacción con 1,5 mM azida sódica. Las absorbancias fueron medidas a 405 nm usando un lector de microplacas (Metrolab).

## **10. LOCALIZACION CITOQUIMICA**

BSA-GlcNAc y BSA-Man fueron marcadas con isotiocianato de fluoresceina (FITC) según procedimientos standard [135]. Se adicionaron lentamente 50  $\mu$ l de FITC (1 mg/ml en DMSO) por ml de solución de proteína (2 mg/ml en 100 mM bicarbonato pH 9,0) y luego se dejó reaccionar por 8 hs a 4°C y oscuridad. Se adicionó NH<sub>4</sub>Cl para una

concentración final de 50 mM y se incubó por 2 hs. Se separó la proteína marcada de la FITC libre por filtración en Sephadex G-25.

Espermatozoides eyaculados, capacitados o tratados con ionóforo fueron fijados en portaobjetos con polilisina (ver sección Ensayos de reacción acrosomal) y luego incubados con 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  NGP-FITC o NGP-biot en PBS 3 mg/ml BSA por 30 min. En los experimentos en que se usó NGP-biot, se detectaron los complejos con avidina-FITC. Se lavó tres veces con PBS entre cada incubación y se montaron los portas con glicerol 90%. Los preparados fueron observados en microscopio de epifluorescencia. Para probar especificidad las mismas incubaciones se llevaron a cabo adicionando 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de NGP no marcada, juntamente con la NGP-FITC.

#### **11. PREPARACION DE NEOGLICOPROTEINAS:**

Las neoglicoproteínas de fucosa, glucosa, galactosa y lactosa fueron preparadas a partir de los respectivos piranosil-fenil isotiocianatos según ha descrito Monsigny y col.[212]. Para ello, se preparó una solución 10,7 mg/ml de albúmina en carbonato 0,1 M pH 9,5. La albúmina debe ser libre de globulinas. A esta solución se adicionaron 80  $\mu\text{moles}$  del correspondiente piranosil-fenil isotiocianato y se incubó con agitación en rotor por 20 horas a 4°C. Luego se dializó contra agua destilada por 24 hs y se liofilizó.

El contenido de monosacárido incorporado por mol de albúmina se determinó según el método de Dubois y col. [52]. Se adicionan 100  $\mu$ l de fenol 5% a 100  $\mu$ l de la solución de neoglicoproteína, y luego 1 ml de ácido sulfúrico. Se esperan 10 minutos y se mide la absorbancia a 490 nm.

Las neoglicoproteínas de N-acetilglucosamina, manosa y N-acetilgalactosamina fueron obtenidas de Sigma Chemical Co.

## **12. CAPACITACION DE LOS ESPERMATOZOIDES:**

Para la capacitación de los espermatozoides humanos se utilizó el medio BWB. Los componentes se agregan a agua destilada y deionizada (15 M $\Omega$  de resistencia o mas) y la solución es esterilizada por filtración en Millipore 0,22  $\mu$ , y se almacena a 4°C. En el momento de usar, se adicionan el piruvato de sodio y la albúmina. Se utilizó albúmina libre de ácidos grasos y globulinas.

Los espermatozoides obtenidos como se ha descrito anteriormente fueron diluidos a una concentración de  $5 \times 10^6$  células/ml de medio y incubados en tubos cónicos con una inclinación de aproximadamente 45° por 18 horas a 37°C y 5% dióxido de carbono. Luego de esta incubación, se observó la viabilidad de los espermatozoides por microscopía óptica.

Para los ensayos en que se quiso determinar el efecto de toxina de Pertussis o toxina de cólera, los espermatozoides fueron capacitados en presencia de estas toxinas. Las concentraciones utilizadas están indicadas en los respectivos experimentos.

### **13. ENSAYOS DE REACCION ACROSOMAL:**

**a. Inducción de la reacción acrosomal:** Para los ensayos de inducción de reacción acrosomal, los diferentes inductores fueron adicionados al medio con espermatozoides capacitados ( $5 \times 10^6$  células/ml). Como control de máxima inducción se utilizó el ionóforo de calcio A23187 o Ionomicina en una concentración final de  $10\mu\text{M}$ .

Para los ensayos de inducción con neoglicoproteínas, se adicionaron diferentes concentraciones, entre 10 y 3000 ng/ml concentración final.

Los espermatozoides fueron incubados con los distintos inductores por 60 minutos a  $37^\circ\text{C}$  y 5%  $\text{CO}_2$ . Al término de esta incubación, se lavaron por tres centrifugaciones con BWW sin albúmina y se fijaron en portaobjetos previamente tratadas con  $2\mu\text{g/ml}$  Poli-L-lisina. Una vez que las células se adhieren en buen número, son permeabilizadas por incubación de 30 minutos en etanol 96% a  $4^\circ\text{C}$ .

Se utilizó la lectina *Pisum sativum* agglutinin marcada con fluoresceína para detección de los espermatozoides reaccionados [65]. Esta lectina reconoce residuos manosa de glicoconjugados, presentes en el contenido acrosomal. Así, es posible diferenciar espermatozoides reaccionados que presentan marca sobre el segmento ecuatorial, de los intactos que presentan marca en todo el acrosoma. Para ello, se incubó con la lectina 100 µg/ml en PBS por 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se lavó tres veces con PBS y se montaron los portaobjetos con glicerol 90%. Los preparados fueron observados en microscopio de epifluorescencia. Las células fueron contadas según [100], considerando reaccionados los espermatozoides con marca sobre el segmento ecuatorial o acrosoma "punteado", que indica reacción acrosomal iniciada. Se contaron por lo menos 100 células de cada preparado.

**b. Ensayos de inhibición:** Se estudió el efecto de distintos monosacáridos y enzimas sobre la reacción acrosomal inducida por neoglicoproteínas. fucosa, manosa, N-acetilgalacosamina o N-acetilglucosamina fueron adicionadas en concentraciones de 1 a 30 mM, junto con el inductor. En el caso de las enzimas, α-manosidasa, galactosiltransferasa o N-acetilglucosaminidasa fueron adicionadas en concentraciones de 1, 2 o 3 µg/ml. Como controles, se agregaron las enzimas o azúcares solos. Como inductor, se utilizó 1 µg/ml de neoglicoproteína (BSA-GlcNAc o BSA-Man).

También se estudió el efecto de ligandos para  $\beta$ NAG: p-nitrofenil-N-acetilglucosaminide, p-aminofenil-N-acetilglucosaminide y N- $\epsilon$ -aminocaproyl-N-acetilglucosaminide fueron usados entre 1 y 30 mM.

El procedimiento de inducción y evaluación de reacción acrosomal fue llevado a cabo como se describió anteriormente.

En algunos casos se expresaron los resultados como % de reacción acrosomal normalizada o % RAN:

$$\%RAN = \frac{\%RAX - \%RAC}{\%RAI - \%RAC}$$

Donde % RAX es el porcentaje de reacción acrosomal en determinado tratamiento; % RAC es el porcentaje de reacción acrosomal en el control (basal); y % RAI es el porcentaje de reacción acrosomal máximo (con ionóforo en los experimentos de inducción, o en ausencia de inhibidor en los experimentos de inhibición).

#### **14. ANALISIS ESTADISTICO**

Los experimentos en que se estudio el efecto de agentes caotrópicos, buffers de alta fuerza iónica, o pH en la solubilización de la  $\beta$ NAG fueron analizados por el método no paramétrico de análisis de varianza de Friedman [279.b]

# **Resultados**

# RESULTADOS

## ESTUDIO DE LA $\beta$ -N-ACETILGLUCOSAMINIDASA EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS.

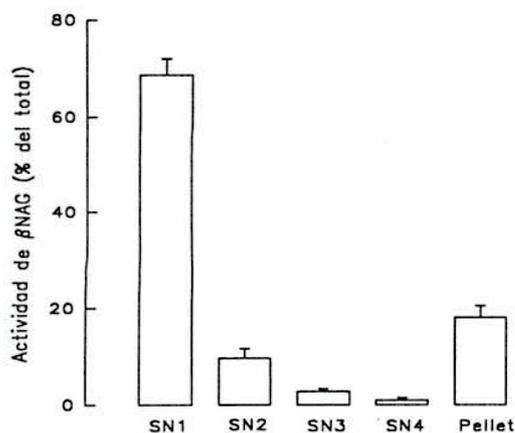
### 1. EXTRACCIONES

Los espermatozoides fueron incubados en diferentes medios, como se describió en la sección Materiales y Métodos. Se observa que incubando en PBS o 0,6 M NaCl no se obtiene la liberación significativa de actividad de  $\beta$ NAG al sobrenadante (Tabla 2), comparando con BWW. Por otro lado cuando los espermatozoides fueron incubados con Tritón X100 o deoxicolato de sodio, se observó un aumento en la actividad medida en el sobrenadante. Sin embargo, para ambos casos, una fracción de  $\beta$ NAG permanece asociada al pellet insoluble en detergente.

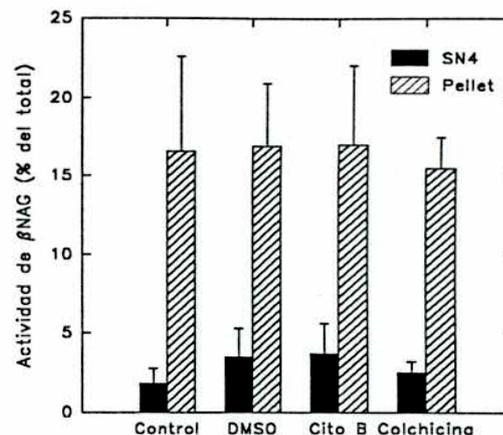
Se realizaron extracciones secuenciales en PBS 1% TX100. Como

**Tabla 2.** Efecto de diferentes medios de incubación en la solubilización de la  $\beta$ NAG de espermatozoides humanos.

Medio	Actividad enzimática (% del Total)
BWW	8.3 $\pm$ 4.8
PBS	10.8 $\pm$ 3.0
0.6 M NaCl	14.8 $\pm$ 4.4
0.1% TX100	70.4 $\pm$ 6.6
0.1% DOC	58.1 $\pm$ 5.9



**Figura 9.** Distribución de la actividad de  $\beta$ NAG en extracciones secuenciales con PBS 1% Tritón X100. Las barras representan el porcentaje de actividad de  $\beta$ NAG en los sucesivos sobrenadantes (SN1 a SN4) y pellet final. Los resultados son la media  $\pm$  errores de 15 experimentos.



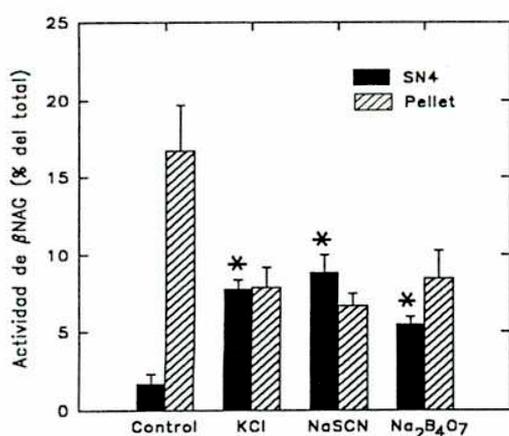
**Figura 10.** Efecto de citocalacina B y colchicina en la extracción de la  $\beta$ NAG insoluble en detergente. Las extracciones fueron llevadas a cabo en PBS 1% TX100 (control) conteniendo, 0,1% DMSO, 10  $\mu$ g/ml citocalacina B (Cito B), o 10  $\mu$ g/ml colchicina. Las barras representan el porcentaje de actividad de  $\beta$ NAG en Pellet y SN4. Los resultados son la media  $\pm$  errores de cuatro experimentos.

se puede observar en la figura 9, luego de cuatro extracciones secuenciales, 18% de la actividad total permanece asociada con el pellet insoluble. Se puede observar que el cuarto SN no presenta significativa actividad.

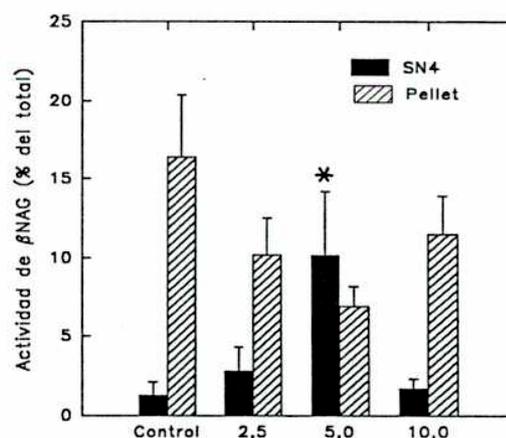
En células somáticas, componentes de membrana han sido descritos estar asociados al pellet insoluble en Tritón X100 [221]. Para determinar este tipo de asociación, diferentes protocolos han sido desarrollados, tales como extracciones en presencia de citocalacina B, extracciones con buffers de alta fuerza iónica, o disminución del pH [90,173,252]. Para estudiar la posible interacción entre la  $\beta$ NAG y el citoesqueleto, se testeó el efecto de agentes perturbadores del citoesqueleto como la citocalacina B que interfiere con la polimerización de la actina. Cuando las extracciones fueron llevadas a cabo en

presencia de 10 o 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de citocalacina B, no se observó una disminución en la asociación de la  $\beta\text{NAG}$  con respecto al control con DMSO (Fig. 10). El mismo resultado fue obtenido cuando se usó colchicina, un alcaloide que se une específicamente a tubulina (Fig. 10). El posible efecto de estos agentes durante la capacitación fue estudiado. Cuando los espermatozoides fueron capacitados en presencia de citocalacina B o colchicina, y sometido a extracciones en presencia de estos agentes, los resultados fueron similares a los observados para espermatozoides no capacitados.

Se investigó la naturaleza de la interacción entre la  $\beta\text{NAG}$  y la fracción celular resistente a detergentes. Cuando se realizó la cuarta extracción en presencia de 1 M KCl, se observó la disociación de una parte (52%) de la enzima insoluble (Fig. 11). Agentes caotrópicos, como



**Figura 11.** Efecto de alta sal y agentes caotrópicos en la extracción de la  $\beta\text{NAG}$  insoluble en detergente. La última extracción fue llevada a cabo en PBS 1% TX100 (control) conteniendo, 1 M KCl, 150 mM NaSCN o 150 mM  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ . Las barras representan el porcentaje de actividad de  $\beta\text{NAG}$  en Pellet y SN4. Los resultados son la media  $\pm$  errores de cuatro experimentos. (\*)  $p < 0,05$  vs. control.



**Figura 12.** Efecto del pH en la extracción de la  $\beta\text{NAG}$  insoluble en detergente. Las barras representan el porcentaje de actividad de  $\beta\text{NAG}$  en Pellet y SN4. Los resultados son la media  $\pm$  errores de cuatro experimentos. (\*)  $p < 0,05$  vs. control.

tiocianato y borato también fueron efectivos en disociar el 61% y 38% de la  $\beta$ NAG insoluble respectivamente (Fig. 11).

Diferentes valores de pH también fueron testeados. Cuando la cuarta extracción fue llevada a cabo a pH extremos como 2,5 o 10,0, no se observó un aumento significativo en la solubilización de la  $\beta$ NAG. (Fig. 12) Por otro lado, extracción a pH 5,0 resultó en la disociación de 56% de la enzima asociada al pellet insoluble en detergente.

## 2. CARACTERIZACION

Para la caracterización de la enzima se utilizaron diversos procedimientos. Se determinó el pH al cual la enzima mostraba máxima actividad, encontrando que el pH óptimo era 4,5. Sus propiedades proteicas, como carga neta, hidrofobicidad y peso molecular, fueron estudiadas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

El peso molecular en condiciones no desnaturizantes se determinó utilizando una columna de filtración molecular, Superosa 12 (Pharmacia), previamente calibrada con patrones de peso molecular conocido. De esta manera se obtuvo un peso molecular nativo de 190 kDa (Fig. 13)

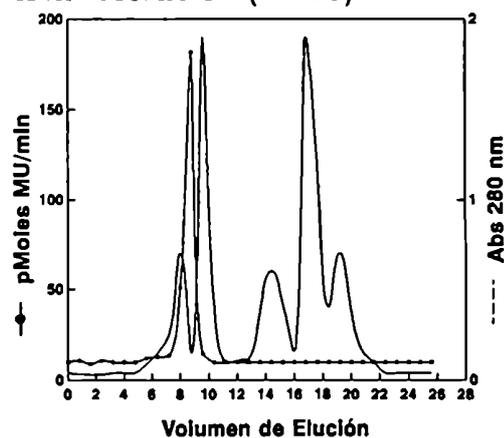
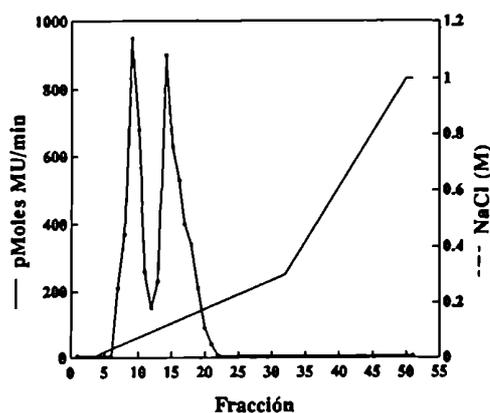


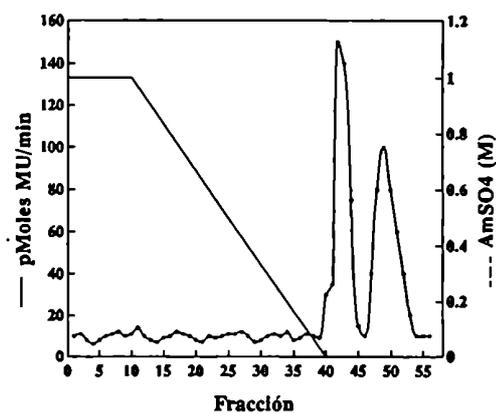
Figura 13. Patrón de elución de la  $\beta$ NAG de espermatozoides humanos en cromatografía de filtración molecular (Superose 12 - HPLC).

Para estudiar las características de carga de la enzima, un extracto proveniente del tratamiento de espermatozoides con deoxicolato fue sembrado en una columna de intercambio aniónico (Mono Q) previamente equilibrada en buffer fosfato 10 mM pH 7. La elución de dicha columna se llevó a cabo mediante un gradiente de fuerza iónica creciente provisto por buffer fosfato 10 mM conteniendo NaCl 1M. Las condiciones de corrida están especificadas en la sección Materiales y Métodos. Se midió la actividad enzimática en cada una de las fracciones obtenidas y se obtuvieron dos fracciones reactivas (Fig. 14).

Las propiedades de la enzima también fueron evaluadas mediante el uso de una columna de interacción hidrofóbica (Phenyl TSK, Pharmacia). El extracto enzimático de espermatozoides fue diluido en un buffer fosfato 100 mM pH 7 con sulfato de amonio 1M. La elución de la columna se llevó a cabo disminuyendo la concentración de sulfato de



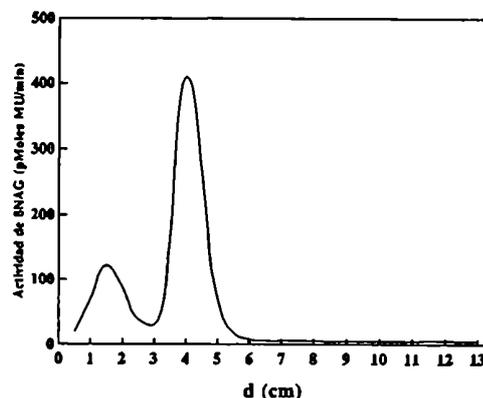
**Figura 14.** Comportamiento de la  $\beta$ NAG de espermatozoides humanos en cromatografía de intercambio iónico (Mono Q - HPLC).



**Figura 15.** Comportamiento de la  $\beta$ NAG de espermatozoides humanos en cromatografía de interacción hidrofóbica (TSK Phenyl 5PW - HPLC).

amonio con un buffer fosfato 100 mM pH 7. Al estudiar el perfil de actividad, nuevamente encontramos dos zonas de actividad (Fig. 15).

Dado que la filtración molecular reveló un solo pico de actividad, y las columnas de intercambio dieron dos picos claramente diferenciables, estaríamos ante la presencia de dos isoenzimas con pesos moleculares similares pero cargas netas diferentes. Para corroborar esta afirmación se estudió la actividad enzimática luego de un fraccionamiento en geles de poliacrilamida nativos. Luego de realizada la electroforesis se detectaron dos regiones de actividad, correspondientes a las distintas isoformas (Fig. 16).

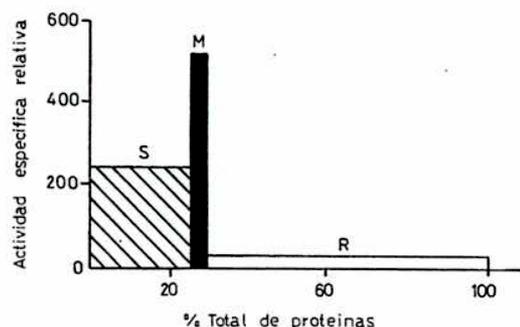


**Figura 16.** Comportamiento de la  $\beta$ NAG de espermatozoides en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes.

### 3. PREPARACIÓN DE MEMBRANAS Y PARTICIÓN CON TRITON X114

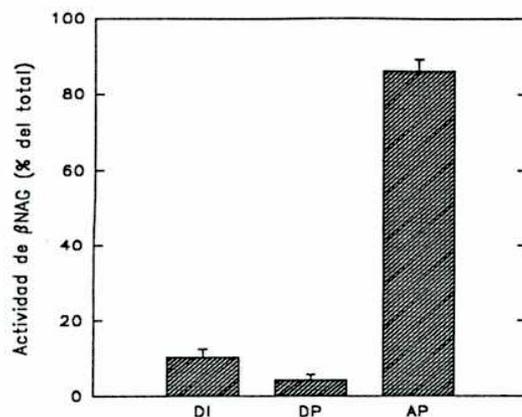
Se determinó la actividad de  $\beta$ NAG en fracciones subcelulares de espermatozoides humanos. Los espermatozoides fueron disgregados por sonicación y sometidos a centrifugaciones como descrito en Materiales y Métodos. Las fracciones fueron clasificadas como sigue: pellet de 2800 g (núcleos e restos de células, fracción residual), sobrenadante de 100.000 g (fracción acuosa) y pellet de 100.000 g (membranas). Cuando se

estudió la distribución de la actividad de  $\beta$ NAG en estas fracciones, se determinó que 6% de la actividad total se encontraba en la fracción de membranas, 73% en la fracción soluble y 21% residual. Graficando los datos según [79], se encontró que la fracción de membranas presentaba mayor actividad específica relativa, en comparación con las fracciones soluble o residual (Fig. 17).



**Figura 17.** Distribución subcelular de la actividad de  $\beta$ NAG en espermatozoides humanos. Las fracciones fueron obtenidas como se ha descrito en Materiales y Métodos: soluble (S), membranas (M), y residual (R). Los datos están graficados como contenido de proteínas relativo versus actividad específica relativa (%actividad/%proteínas) de acuerdo con deDuve. Los resultados son representativos de cuatro experimentos.

Con las preparaciones de membrana obtenidas como descrito anteriormente, se realizó partición de fases en Tritón X114, con el objetivo de determinar la naturaleza de la asociación de la  $\beta$ NAG presente en membrana. El tratamiento de membranas con este detergente a 4°C libera proteínas que son separadas en fases hidrofílica y hidrofóbica cuando llevadas a 20°C [34]. Las preparaciones de membranas de espermatozoides fueron sometidas a separación de fases en Tritón X114 usando un procedimiento que permite distinguir entre proteínas integrales de membrana (DP), proteínas ancladas por glicosilfosfatidil inositol (DI), o proteínas hidrofílicas solubles (AP) [140]. Se determinó que la  $\beta$ NAG que se encuentra asociada a la preparación de membrana es



**Figura 18.** Separación de fases con Tritón X114. Las membranas de espermatozoides humanos fueron obtenidas y tratadas como se ha descrito en Materiales y Métodos. Las barras representan el porcentaje de actividad de  $\beta$ NAG en el pellet insoluble en detergente (DI), en la fase rica en detergente (DP), y en la fase acuosa (AP). Los resultados son la media  $\pm$  errores de cuatro experimentos.

principalmente de naturaleza hidrofílica, una vez que 86% de la actividad está en la fase acuosa (Fig. 18). La actividad remanente de  $\beta$ NAG se distribuyó como 10% DI y 4% DP.

#### 4. $\beta$ NAG DURANTE LA CAPACITACION Y LA REACCION ACROSOMAL

La capacitación y la reacción acrosomal son dos eventos que debe sufrir el espermatozoide para fertilizar al ovocito. Se investigó la posible relación entre la actividad de  $\beta$ NAG y estos eventos. Con este objetivo, se

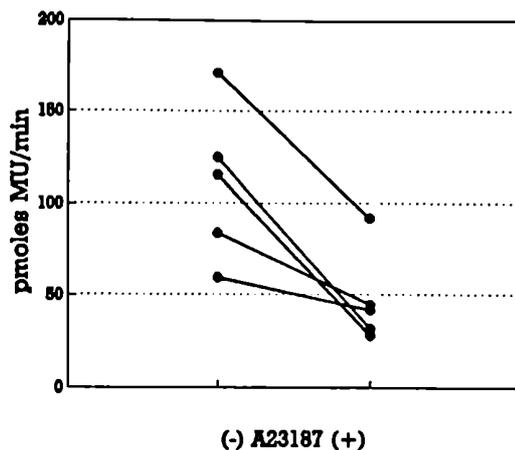
**Tabla 3.** Efecto del tiempo de capacitación sobre la actividad de  $\beta$ NAG.

Tiempo (horas)	Actividad de $\beta$ NAG (Unidades Arbitrarias)
0	139 $\pm$ 17
1	162 $\pm$ 11
2	148 $\pm$ 13
8	132 $\pm$ 6
16	198 $\pm$ 15

Los espermatozoides fueron capacitados en BWW. En cada tiempo indicado, se tomó una alícuota equivalente a 106 espermatozoides, y se midió actividad de  $\beta$ NAG.

tomaron alícuotas de espermatozoides a lo largo de la capacitación y se determinó actividad enzimática. Como se puede observar en la tabla 3, no hay cambios significativos en la actividad de  $\beta$ NAG durante la capacitación. Por otro lado, se determinó la actividad de  $\beta$ NAG los espermatozoides luego de

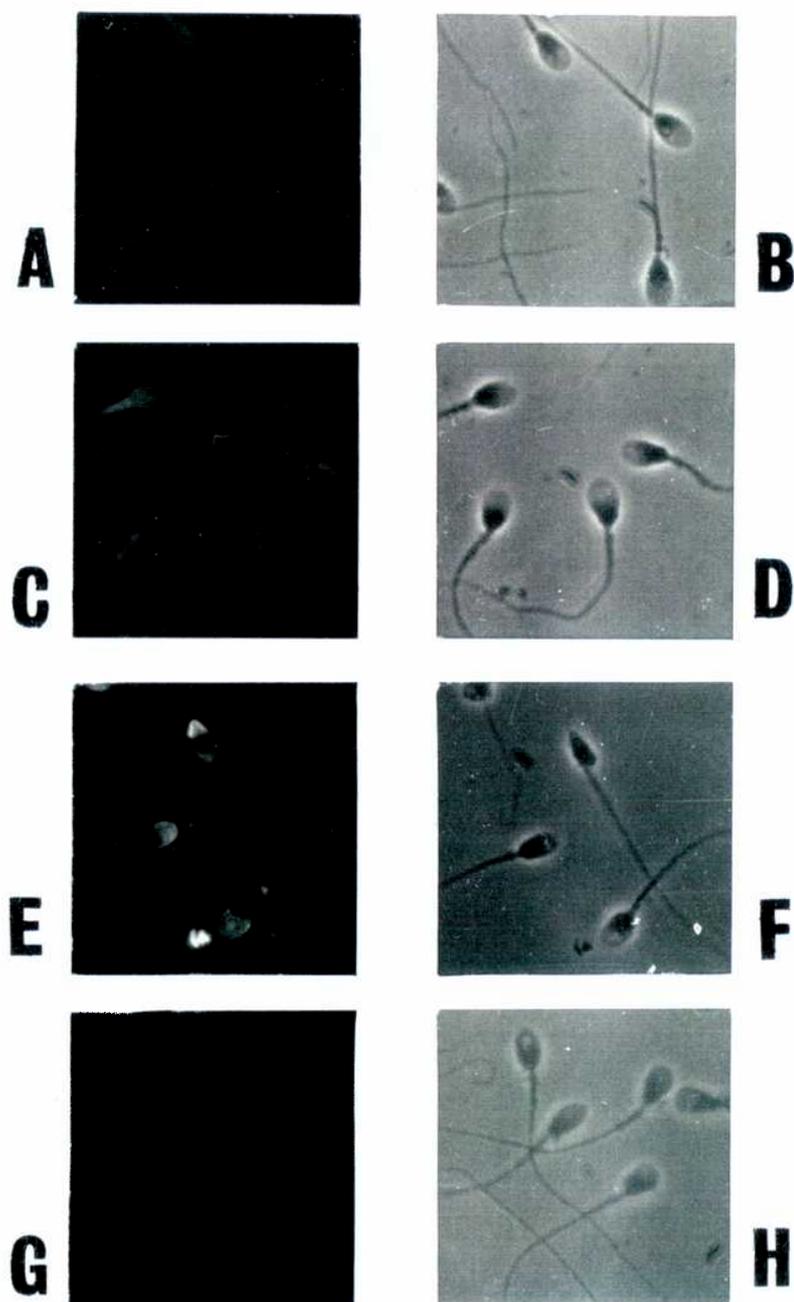
incubados con ionóforo de calcio. Se observó una disminución ( $40\% \pm 8$  vs. control) en la actividad de  $\beta$ NAG con la reacción acrosomal (Fig. 19). La disminución es proporcional al porcentaje de células reaccionadas ( $38 \pm 5$  sobre control), medidas por tinción con PSA-FITC [65], probablemente relacionada con la pérdida de contenido acrosomal.



**Figura 19.** Efecto de la reacción acrosomal sobre la actividad de  $\beta$ NAG. Se midió actividad de  $\beta$ NAG en espermatozoides capacitados (-) y luego de tratados con ionóforo de calcio A23187(+). Cada curva representa una muestra distinta.

## 5. LOCALIZACION

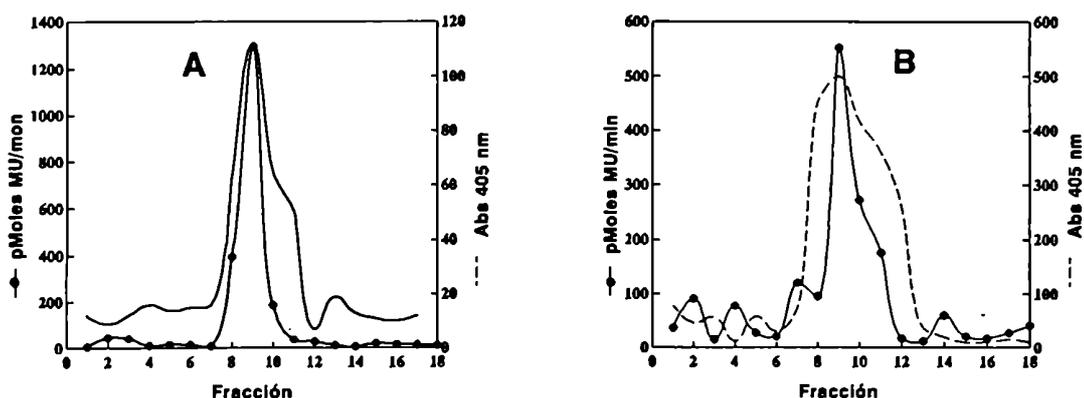
El estudio de la localización de la enzima se llevó a cabo por microscopía de fluorescencia usando la neoglicoproteína p-aminofenil- $\beta$ -N-acetilglucosamina-BSA marcada con fluoresceína (BSA-GlcNAc-FITC). También se utilizó la neoglicoproteína marcada con biotina (BSA-GlcNAc-biot), y luego se detectó con avidina-fluoresceína. Por ambos procedimientos, una marcación débil de fluorescencia pudo ser detectada en la cabeza de espermatozoides eyaculados (Fig. 20 A). La intensidad de la marca es similar en espermatozoides capacitados (Fig. 20 C).



**Figura 20.** Espermatozoides eyaculados (A), capacitados (C), o tratados con ionóforo (E) incubados con BSA-GlcNAc-FITC, como se ha descrito en Materiales y Métodos. (G) Espermatozoides capacitados incubados con exceso de BSA-GlcNAc no fluoresceinada. (B,D,F,H) Contraste de fase de (A,C,E,G) respectivamente.

Finalmente, la localización de la enzima en espermatozoides tratados con ionóforo de calcio para inducir la reacción acrosomal, revela mayor intensidad en la región del capuchón acrosomal (Fig. 20 E). En experimentos control, la co-incubación con BSA-GlcNAc no marcada, en un exceso de 100 veces la de la marcada, elimina completamente la fluorescencia (Fig. 20 G).

Para validar este ensayo, estudiamos si la molécula que une BSA-GlcNAc es la  $\beta$ NAG. Extractos de espermatozoides fueron sometidos a cromatografía de afinidad en Concanavalina-A Sepharosa y Blue Sepharosa y a las fracciones de cada columna se ensayó actividad de  $\beta$ NAG y unión a BSA-GlcNAc, como se describió en la sección Materiales y Métodos. En ambos casos, las fracciones con actividad enzimática fueron las que exhibieron unión de BSA-GlcNAc (Fig. 21), indicando que esta neoglicoproteína realmente se une a  $\beta$ NAG.



**Figura 21.** Ensayo de unión a BSA-GlcNAc. Extractos de espermatozoides fueron sometidos a cromatografía líquida en Concanavalina-A Sepharose (A) o Cibacron Blue Sepharose (B). Las fracciones fueron ensayadas para actividad de  $\beta$ NAG y unión a BSA-GlcNAc como se ha descrito en Materiales y Métodos.

## 6. DISCUSION

Se ha descrito que los órganos reproductivos presentan alta actividad de glicosidasas, ej.  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa y  $\alpha$ -manosidasa en epidídimo y  $\beta$ -glucuronidasa en glándulas preputiales [57, 124]. La  $\beta$ NAG ha sido descrita en espermatozoides de varias especies y en general presenta la mayor actividad específica entre las glicosidasas de este tipo celular [5, 160, 196, 286]. Nuestros estudios muestran que en espermatozoides humanos esta enzima está presente como dos isoformas principales, identificadas por cromatografía de intercambio iónico, geles de poliacrilamida no desnaturizantes y cromatografía de interacción hidrofóbica. Estos datos en conjunto con los obtenidos por filtración molecular indican que las isoenzimas presentan peso molecular similar y difieren en su carga neta, de acuerdo con lo generalmente descrito en otros tejidos [254, 287].

El tratamiento de espermatozoides humanos con Tritón X100 resultó en la identificación de un "pool" de  $\beta$ NAG que está asociada al residuo insoluble en detergente. Métodos comúnmente empleados para distinguir entre proteínas periféricas y integrales de membrana, tales como tratamiento con alta fuerza iónica o pH extremos fueron usados. El efecto de agentes caotrópicos que han sido descritos para disociación o solubilización de complejos proteicos [304] fue también investigado. Buffers con alta sal y agentes caotrópicos fueron capaces de disociar la

enzima insoluble en detergente, sugiriendo que esta porción de  $\beta$ NAG estaría periféricamente asociada a estructuras celulares resistentes al tratamiento con Tritón. Esta enzima también ha sido descrita en formas soluble y insoluble en espermatozoides de búfalo y carnero [5].

La acrosina, la serina-proteasa específica del espermatozoide, ocurre en formas soluble y resistente a detergente [218]. Esta proteína ha sido descrita como asociada a las membranas acrosomales por componente(s) de la matriz acrosomal [134]. Resultados similares fueron reportados para la proteína acrosomal SP-10 [107], donde el pool resistente a detergente no es solubilizado por alta fuerza iónica y si por pH extremos o agentes caotrópicos. La  $\beta$ NAG de espermatozoides humanos es dissociable por alta fuerza iónica pero no por pH extremos.

Por otro lado, la localización acrosomal de la  $\beta$ NAG fue detectada por fluorescencia en espermatozoides tratados con ionóforo. Esto muestra que existiría una fracción importante de la enzima que permanece unida al espermatozoide luego de la reacción acrosomal probablemente asociada a la matriz acrosomal o a la membrana acrosomal interna.

La malla insoluble que resiste al tratamiento con Tritón X100 consiste principalmente de citoesqueleto celular [221]. Un criterio comúnmente usado para determinar la posible asociación de un

determinado componente con el citoesqueleto es el uso de agentes que lo modifiquen [90, 173, 252]. Entre estos, las citocalasinas bloquean específicamente la polimerización de los filamentos de actina, pero la depolimerización no es afectada. El espermatozoide es una célula altamente diferenciada, por lo tanto mecanismos celulares distintos a los que ocurren en células somáticas pueden tener lugar. Posibles modificaciones en el citoesqueleto pueden requerir un largo período de tiempo. Los espermatozoides de mamíferos luego de eyaculados deben residir en el tracto femenino (o incubados en medio adecuado) por determinado tiempo para sufrir el proceso de capacitación [6,50] donde adquieren la capacidad de fertilizar ovocitos. Los efectos de citocalasina B y colchicina en la disociación no fueron significativos, tanto para espermatozoides eyaculados como para capacitados, sugiriendo que la asociación de la  $\beta$ NAG con el pellet insoluble en detergente involucra un mecanismo distinto.

Se encontró  $\beta$ NAG anclada por glicosilfosfatidil-inositol en la membrana plasmática de ovocitos de acidia [174]. Cuando las membranas de espermatozoides fueron sometidas a partición de fases en Tritón X114, se encontró que la  $\beta$ NAG asociada a membranas es de naturaleza hidrofílica y no sería una proteína estructural de membrana. La interacción de la  $\beta$ NAG con la membrana debe corresponder a asociación con componentes estructurales de la membrana. También se encontró actividad en el pellet insoluble en detergente, que podría representar una pequeña cantidad de enzima anclada por GPI. Sin

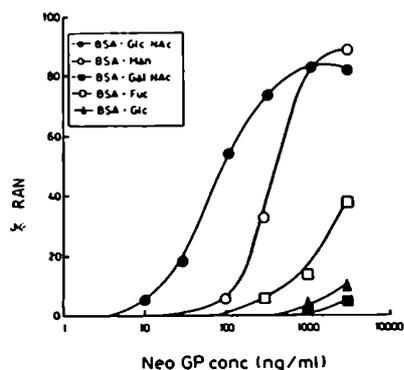
embargo, esta posibilidad debe ser confirmada por estudios con fosfolipásas específicas.

Los resultados del fraccionamiento subcelular indican que la  $\beta$ NAG del espermatozoide presenta la mayor actividad específica relativa en membranas, opuesto a lo previamente descrito por otros investigadores [317]. Se encontró elevada actividad específica de la  $\beta$ NAG en membranas purificadas de espermatozoides de rata [127], indicando que por lo menos una forma de esta glicosidasa está unida a membrana. Enzimas, entre ellas glicosidasas, han sido sugeridas como mediadores importantes de la interacción entre gametas [59, 119, 209]. La presencia de alta actividad específica de  $\beta$ NAG en membranas de espermatozoides, sugiere un papel para esta enzima en el mecanismo de fertilización.

## PARTICIPACION DE LA $\beta$ -N-ACETILGLUCOSAMINIDASA EN LA REACCION ACROSOMAL DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS

### 1. INDUCCION DE LA REACCION ACROSOMAL POR NEOGLICOPROTEINAS.

Se estudió la capacidad de varias neoglicoproteínas para inducir la reacción acrosomal en espermatozoides humanos. Concentraciones de 10 a 3000 ng/ml fueron usadas. BSA-GlcNAc y BSA-Man fueron efectivas para inducir la reacción acrosomal, alcanzando su máximo efecto a 1  $\mu$ g/ml (Fig. 22). Estas dos neoglicoproteínas muestran diferentes curvas dosis-respuesta. BSA-GlcNAc es efectiva a partir de 30  $\mu$ g/ml y llega a la mitad de su máximo efecto a 100  $\mu$ g/ml. Por otro lado, cuando las células fueron incubadas con BSA-Man se observa muy poco efecto a esta última concentración. A 300  $\mu$ g/ml BSA-Man presenta cerca de 40% de su máxima estimulación, mientras que BSA-GlcNAc alcanza casi su máximo efecto. Sin embargo, en el rango de  $\mu$ g/ml ambas neoglicoproteínas poseen el mismo efecto estimuladorio.

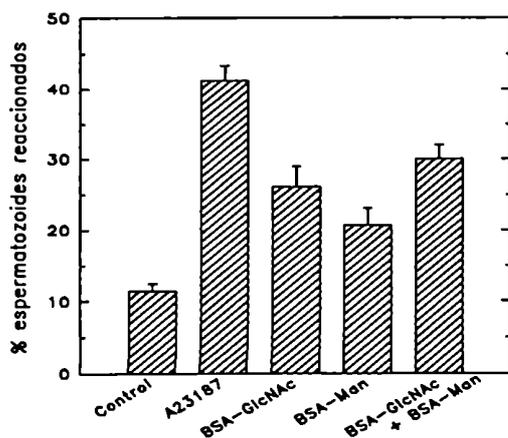


**Figura 22.** Inducción de la reacción acrosomal por neoglicoproteínas. Espermatozoides capacitados fueron incubados con neoglicoproteínas como se ha descrito anteriormente. Los resultados están expresados como % RAN (% reacción acrosomal normalizada, ver Materiales y Métodos) versus concentración de neoglicoproteína. Los resultados son representativos de cuatro experimentos. Cada punto representa la media de duplicados.

La BSA-Fuc indujo la reacción acrosomal (10 % sobre el control) solo en la mayor concentración testeada (Fig. 22). Incubación con otras neoglicoproteínas, como BSA-Gal, BSA-Glc, BSA-GalNAc y BSA-Lac no aumentaron el porcentaje de reacción acrosomal con respecto a los controles.

Varios monosacáridos componentes de las neoglicoproteínas usadas fueron testeados por su posible capacidad de inducir la reacción acrosomal. La incubación con 30 mM glucosa, galactosa, N-acetilglucosamina, fucosa, o N-acetilgalactosamina, no resultó en el incremento del porcentaje de reacción acrosomal con relación a los controles.

Para probar se BSA-GlcNAc y BSA-Man presentaban sinergismo

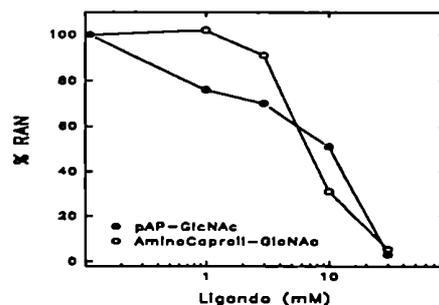
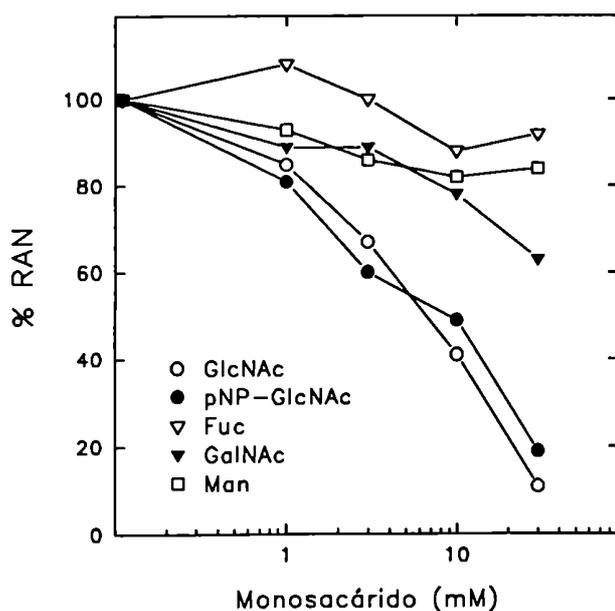


**Figura 23.** Inducción de la reacción acrosomal por neoglicoproteínas. Porcentaje de reacción acrosomal en espermatozoides capacitados incubados 60 min con 10  $\mu$ M A23187, 300 ng/ml BSA-GlcNAc, 300 ng/ml BSA-Man o 300 ng/ml de cada NGP. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes. Las barras de error representan el rango de duplicados.

en capacidad de inducir la reacción acrosomal, se incubó simultáneamente con ambas neoglicoproteínas en una concentración sub-optima (0,3  $\mu$ g/ml). No se observó un incremento en el porcentaje de células reaccionadas en comparación con los efectos independientes de cada una (Fig. 23)

## 2. ESPECIFICIDAD DE LIGANDO

La especificidad de la inducción por BSA-GlcNAc y BSA-Man fue testada por la adición de diferentes monosacáridos al medio juntamente con las neoglicoproteínas. La reacción acrosomal inducida por BSA-GlcNAc fue inhibida tanto por 30 mM N-acetilglucosamina (90%) como por p-nitrofenil-N-acetilglucosamina, el derivado acoplado covalentemente a BSA (81%) (Fig. 24 A). Mientras que no se observó inhibición con manosa o fucosa, N-acetilgalactosamina parece inhibir parcialmente (38% a 30 mM). Dos ligandos específicos para  $\beta$ NAG, 2-acetamido-N-( $\epsilon$ -aminocaproil)-2-deoxi- $\beta$ -D-glucopiranosilamina y p-aminofenil 2-acetamido-2-deoxi- $\beta$ -D-glucopiranosido, fueron testados a una concentración de 30 mM. Estos dos ligandos fueron capaces de inhibir la inducción de la reacción acrosomal por BSA-GlcNAc en 90-95%. (Fig. 24 B)

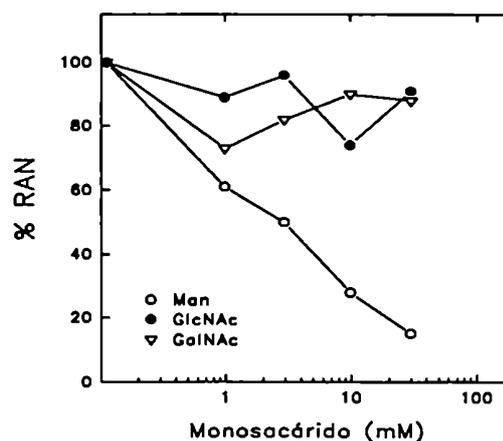


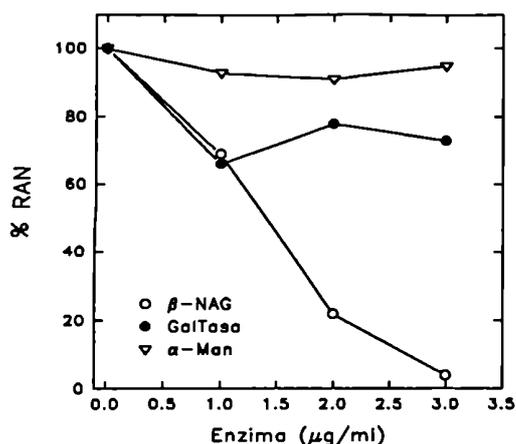
**Figura 24.** Inhibición de la reacción acrosomal inducida por BSA-GlcNAc por monosacáridos. Los espermatozoides capacitados fueron incubados 60 min con 1  $\mu$ g/ml BSA-GlcNAc en presencia de diferentes monosacáridos (a) o derivados glicosilados (b). Los resultados están expresados como % RAN (ver Materiales y Métodos), y son representativos de tres experimentos independientes.

Un efecto inhibitorio de 85% fue producido por la presencia de 30 mM manosa en la reacción acrosomal inducida por BSA-Man, mientras N-acetilglucosamina y N-acetilgalactosamina no causaron ningún efecto (Fig. 25).

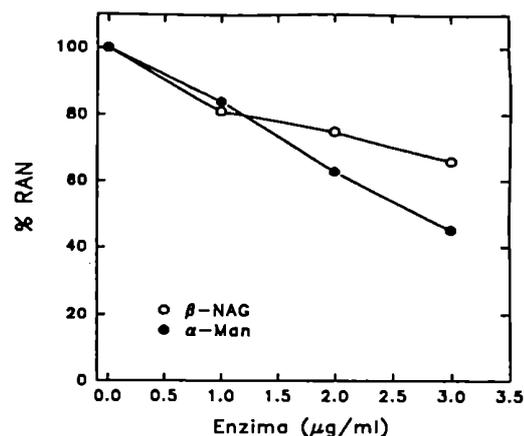
Para estudiar la posible participación de enzimas en el mecanismo de inducción por neoglicoproteínas, se realizaron ensayos de inhibición. Para ello, el efecto de enzimas solubles sobre la exocitosis acrosomal inducida por neoglicoproteínas fue evaluado. Cuando las células fueron incubadas con 3  $\mu\text{g/ml}$  de  $\beta\text{NAG}$ , se observó una inhibición de 96% en la reacción acrosomal inducida por BSA-GlcNAc (Fig. 26).  $\alpha$ -manosidasa soluble no produjo efecto inhibitorio. La adición de galactosiltransferasa produjo una inhibición de 27%, sin embargo, con mayores concentraciones de la enzima no se logró una mayor inhibición (Fig. 26). Tanto  $\beta\text{NAG}$  como  $\alpha$ -manosidasa inhibieron parcialmente (34% y 55% respectivamente) la reacción acrosomal inducida por 1  $\mu\text{g/ml}$  BSA-Man (Fig. 27).

**Figura 25.** Inhibición de la reacción acrosomal inducida por BSA-Man por monosacáridos. Los espermatozoides capacitados fueron incubados 60 min con 1  $\mu\text{g/ml}$  BSA-Man en presencia de diferentes monosacáridos. Los resultados están expresados como en la figura 24, y son representativos de tres experimentos independientes.





**Figura 26.** Inhibición de la reacción acrosomal inducida por BSA-GlcNAc por enzimas. Los espermatozoides capacitados fueron incubados 60 min con 1 µg/ml BSA-GlcNAc en presencia de diferentes enzimas. Los resultados están expresados como en la figura 24, y son representativos de tres experimentos independientes.

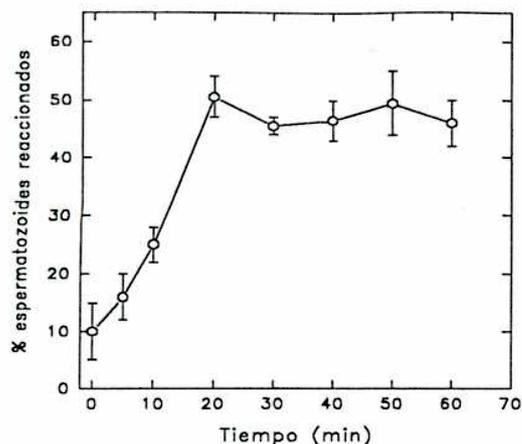


**Figura 27.** Inhibición de la reacción acrosomal inducida por BSA-Man por enzimas. Los espermatozoides capacitados fueron incubados 60 min con 1 µg/ml BSA-Man en presencia de diferentes enzimas. Los resultados están expresados como en la figura 24, y son representativos de tres experimentos independientes.

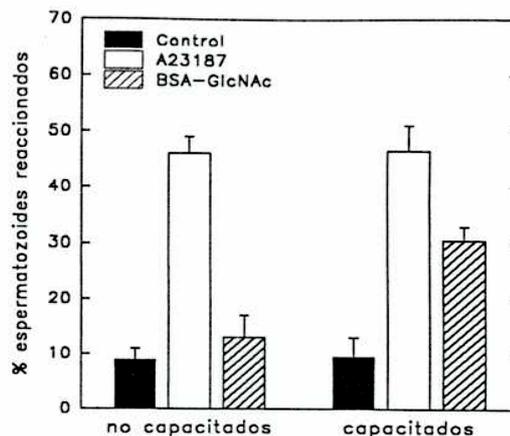
### 3. CARACTERIZACION DE LA INDUCCION DE LA RA POR NEOGLICOPROTEINAS

La cinética de inducción por BSA-GlcNAc está representada en la figura 28. A los 10 minutos se observa la mitad del efecto máximo, que se alcanza a los 20 minutos.

Cuando los espermatozoides no capacitados fueron incubados con 1 µg/ml BSA-GlcNAc, se observó un aumento de 9% a 13% en el porcentaje de reacción acrosomal (Fig. 29). Para espermatozoides capacitados, incubados bajo las mismas condiciones con NGP, el porcentaje de reacción acrosomal fue tres veces mayor que para los



**Figura 28.** Cinética de inducción de la reacción acrosomal por BSA-GlcNAc. Espermatozoides capacitados fueron incubados con 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  BSA-GlcNAc por diferentes tiempos. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

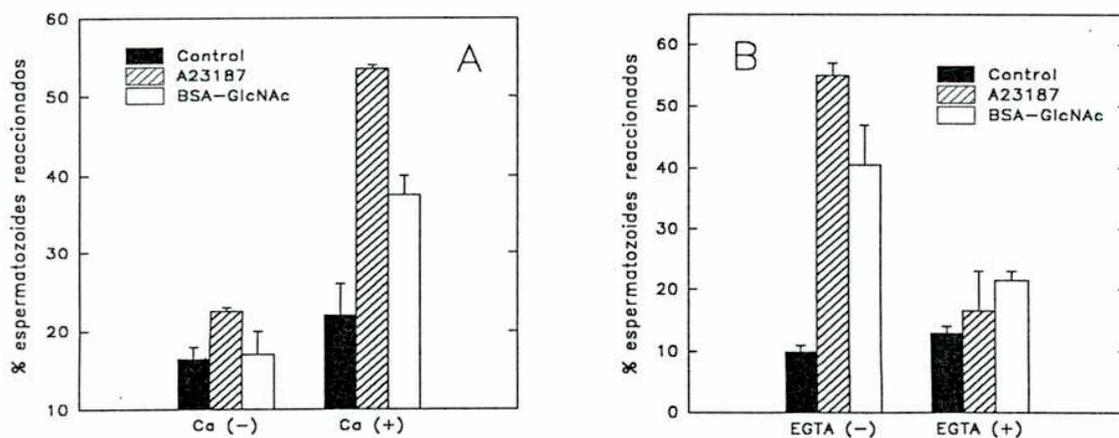


**Figura 29.** Dependencia de la capacitación en la reacción acrosomal inducida por BSA-GlcNAc. Porcentaje de reacción acrosomal en espermatozoides capacitados o no capacitados incubados 60 min con 10  $\mu\text{M}$  A23187 o 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  BSA-GlcNAc. Los resultados son representativos de tres experimentos similares.

controles. La inducción de la reacción acrosomal por ionóforo de calcio alcanza 45% en ambos los casos.

Como la reacción acrosomal requiere la presencia de calcio, estudiamos su participación en el efecto desencadenado por BSA-GlcNAc. Para ello, seguimos dos estrategias distintas. Cuando los espermatozoides fueron capacitados en medio libre de calcio, la adición de BSA-GlcNAc no resultó en la inducción de la reacción acrosomal (Fig. 30 A). La subsecuente adición de calcio junto con la neoglicoproteína resultó en un aumento de dos veces en el porcentaje de reacción acrosomal. Por otro lado, cuando los espermatozoides fueron capacitados en medio completo (con calcio), la adición de EGTA bloqueó la inducción de la reacción acrosomal por BSA-GlcNAc (Fig. 30B).

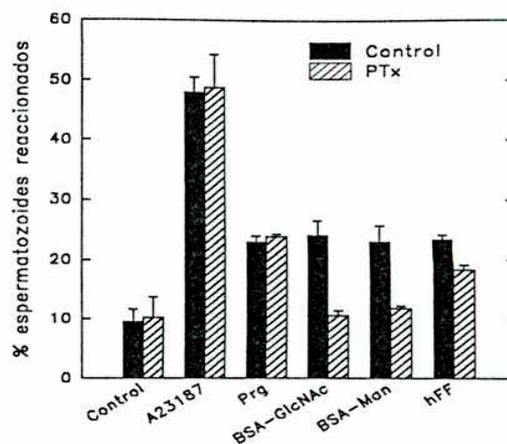
Los espermatozoides de mamíferos poseen proteínas regulatorias de unión a nucleótidos de guanina de tipo inhibitorio o Gi, que son ADP-ribosiladas por acción de la toxina de Pertussis [19,168], y aparentemente juegan un importante papel en la reacción acrosomal inducida por zona pellucida [94,167]. Se demostró que el tratamiento con esta toxina es capaz de inhibir la exocitosis acrosomal inducida por ZP en ratón [94], bovino [105] y humanos [82]. Por otro lado, esta toxina no afecta la reacción acrosomal inducida por progesterona en espermatozoides humanos [300]. El efecto de toxina de Pertussis, así como de toxina colérica, sobre la reacción acrosomal inducida por neoglicoproteínas fue investigado. Cuando los espermatozoides fueron capacitados en presencia de toxina Pertussis, la exocitosis inducida por neoglicoproteínas fue totalmente inhibida, tanto para BSA-GlcNAc como para BSA-Man (Fig. 31). La inducción por ionóforo de calcio A23187, así como por progesterona no fueron afectadas por el tratamiento con esta toxina.



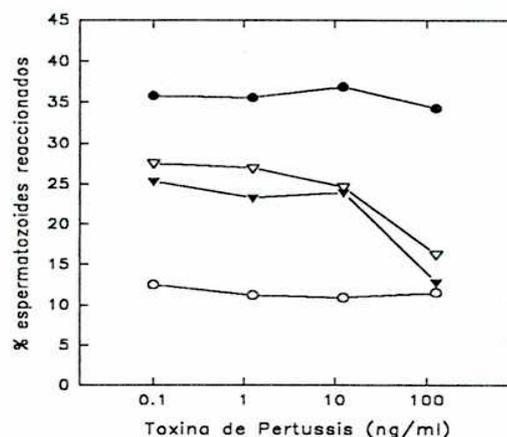
**Figura 30.** Dependencia de calcio en la reacción acrosomal inducida por BSA-GlcNAc. (a) Porcentaje de reacción acrosomal en espermatozoides capacitados en medio sin calcio y luego incubados 10  $\mu$ M A23187 o 1  $\mu$ g/ml BSA-GlcNAc en presencia o ausencia de calcio. (b) Porcentaje de reacción acrosomal en espermatozoides capacitados en medio completo y luego incubados con los inductores e presencia o ausencia de 2 mM EGTA. Los resultados son representativos de tres experimentos similares. Las barras representan la media  $\pm$  errores de duplicados.

En la figura 32 se muestran las curvas dosis-respuesta para la inhibición por toxina Pertussis de la reacción acrosomal inducida por neoglicoproteínas. La inhibición del efecto de las neoglicoproteínas se observó con 125  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de toxina. No se observaron diferencias en las células inducidas con ionóforo, o en las células control.

Componentes del fluido folicular están descriptos como inductores de la reacción acrosomal [268,303]. El efecto de la toxina de Pertussis sobre la exocitosis inducida por fluido folicular fue estudiada, y se observa una disminución del 20% en el porcentaje de células reaccionadas (Fig. 31). El fluido folicular, en la dilución usada en el ensayo presentaba 45 ng/ml de progesterona, determinado por radioinmunoensayo. Esta



**Figura 31.** Efecto de la toxina de Pertussis en la reacción acrosomal inducida por NGP. Los espermatozoides fueron capacitados en presencia o ausencia de 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PTx, antes de la adición de diferentes inductores como se ha descrito en Materiales y Métodos. Los resultados son representativos de tres experimentos similares. Las barras representan la media  $\pm$  error de ensayos duplicados.

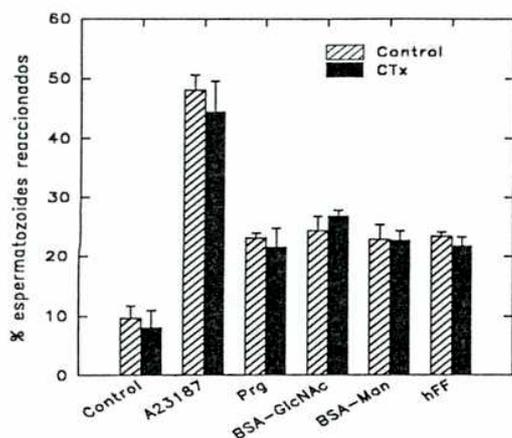


**Figura 32.** Efecto dosis-respuesta de la toxina de Pertussis en la reacción acrosomal inducida por NGP. Los espermatozoides fueron capacitados con las concentraciones indicadas de PTx, y luego incubados con 10  $\mu\text{M}$  A23187 ( ), 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  BSA-GlcNAc ( ), 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  BSA-Man ( ), o BWW como control ( ). Los resultados son representativos de tres experimentos similares. Cada punto representa la media de ensayos duplicados.

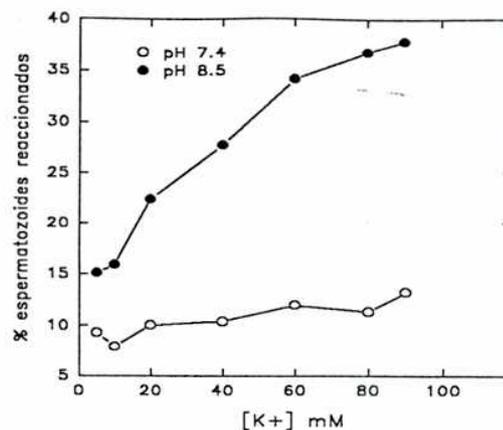
concentración de progesterona no es suficiente para inducir la reacción acrosomal.

La ausencia de un sustrato para ADP-ribosilación por toxina de cólera ha sido reportada [138,168] tanto para espermatozoides de vertebrados como invertebrados. Esta toxina, generalmente asociada con la presencia de subunidades regulatorias estimuladoras o Gs, también es incapaz de alterar la inducción de la reacción acrosomal por zona pellucida en humanos [182]. El efecto de la toxina de cólera sobre la reacción acrosomal inducida por los agentes usados anteriormente fue estudiada. El pretratamiento de los espermatozoides con toxina de cólera no alteró la inducción de la reacción acrosomal por BSA-GlcNAc, BSA-Man, A23187, progesterona, o fluido folicular (Fig. 33), ni la reacción acrosomal espontánea (control).

Evidencias electrofisiológicas y farmacológicas sugieren que los espermatozoides de mamíferos poseen canales de calcio voltaje dependiente (VDCC) [11,63]. La exocitosis acrosomal puede ser estimulada por depolarización de la membrana inducida por altas concentraciones de potasio. Ambas reacciones, inducidas por zona pellucida o por depolarización de membranas, presentan similar sensibilidad a varios antagonistas de VDCC. [103]. La participación de estos mecanismos en la reacción acrosomal inducida por neoglicoproteínas fue estudiado. En primer lugar, se determinó el efecto de la depolarización de membrana sobre la reacción acrosomal. Cuando los espermatozoides fueron incubados con concentraciones crecientes de



**Figura 33.** Efecto de la toxina de cólera en la reacción acrosomal inducida por NGP. Los espermatozoides fueron capacitados en presencia o ausencia de 1  $\mu$ g/ml CTx, antes de la adición de diferentes inductores como se ha descrito en Materiales y Métodos. Los resultados son representativos de tres experimentos similares. Las barras representan la media  $\pm$  error de ensayos duplicados.



**Figura 34.** Inducción de la reacción acrosomal por depolarización de membranas. Los espermatozoides capacitados fueron transferidos al medio BWW modificado con distintas concentraciones de K<sup>+</sup>, pH 8,5 o pH 7,4; y luego incubados 30 minutos a 37 C. Los resultados son representativos de tres experimentos similares. Cada punto representa la media de ensayos duplicados.

potasio en medio control (pH 7,4), no se observaron cambios en el porcentaje de células reaccionadas (Fig. 34). Sin embargo, a pH 8.5 se observa un aumento en la reacción acrosomal correlacionada con el incremento en la concentración de potasio. El máximo efecto (38% de espermatozoides reaccionados) fue observado a 90 mM KCl.

El efecto de antagonistas de canales de calcio en la reacción acrosomal inducida por depolarización de membrana se muestra en la figura 35. Nitrendipina y verapamil, que bloquean específicamente canales de calcio de tipo L [141,284], fueron mas eficientes que w-conotoxina a una concentración de 10  $\mu$ M. Estos antagonistas alcanzaron su  $EC_{50}$  en el rango de nM (60, 100 y 400 nM respectivamente). Se necesita mayor concentración de níquel, lantano o cadmio para inhibir la reacción acrosomal inducida por depolarización de

**Tabla 4.** Efecto de antagonistas de canales de calcio en la reacción acrosomal inducida por NGP.

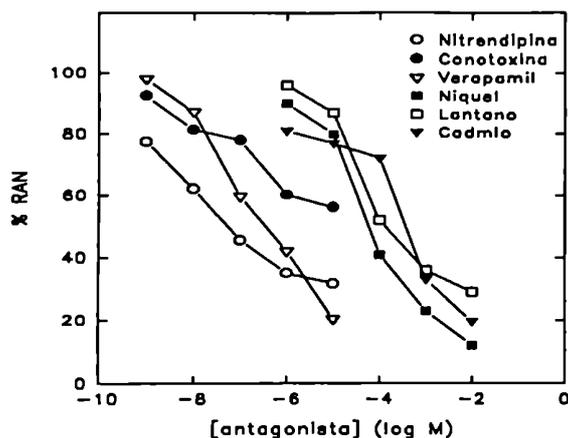
	BWW	BSA-GlcNAc	BSA-Man
Control	11 ± 1	25 ± 1	25 ± 2
Nitrendipina	13 ± 2	14 ± 3	12 ± 4
Verapamil	10 ± 2	14 ± 3	18 ± 1
$\omega$ -conotoxina	9 ± 5	12 ± 3	11 ± 4
Lantano	10 ± 3	10 ± 3	11 ± 1
Níquel	8 ± 3	10 ± 3	10 ± 1
Cadmio	11 ± 1	11 ± 6	13 ± 4

Los espermatozoides capacitados fueron transferidos al medio BWW modificado (80 mM K<sup>+</sup>, pH 6,5) conteniendo 1  $\mu$ M nitrendipina, verapamil, o  $\omega$ -conotoxina; o 1 mM níquel, lantano, o cadmio. Células incubadas en BWW fueron usadas como control. Luego de ajustar el pH a 7,4, se agregó BSA-GlcNAc o BSA-Man para una concentración final de 1  $\mu$ g/ml. Luego de 30 min a 37 C se tomaron alícuotas para determinar el porcentaje de reacción acrosomal. Los resultados son representativos de tres experimentos similares.

membrana y sus CE<sub>50</sub> fueron de 80  $\mu$ M para Ni<sup>2+</sup> y La<sup>3+</sup> y de 400  $\mu$ M para Cd<sup>2+</sup>.

Los antagonistas de calcio fueron testeados en la reacción acrosomal inducida por neoglicoproteínas. Nitrendipina, verapamil y  $\omega$ -conotoxina fueron usados a una concentración de 1  $\mu$ M; mientras que níquel, cadmio y lantano a 1 mM. Todos estos agentes fueron capaces de inhibir la reacción acrosomal inducida por neoglicoproteínas (Tabla 4).

Finalmente, se investigó el efecto de la toxina de Pertussis en la reacción acrosomal inducida por depolarización de membrana. El pretratamiento con toxina de Pertussis no modifica el porcentaje de espermatozoides reaccionados inducido por el aumento de pH y concentración de potasio (Fig. 36).



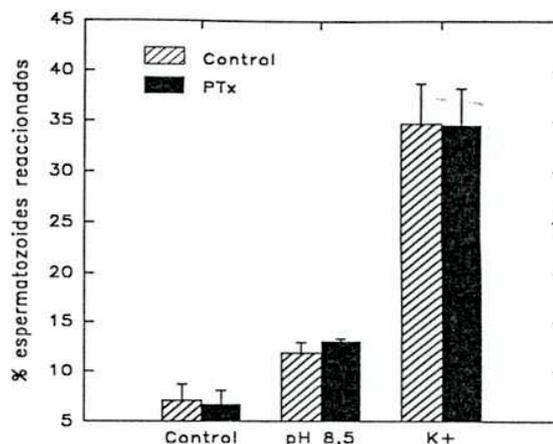
**Figura 35.** Efecto de antagonistas de canales de calcio en la reacción acrosomal inducida por depolarización. Los espermatozoides capacitados fueron transferidos al medio BWB modificado (80 mM K<sup>+</sup>, pH 6.5) conteniendo las concentraciones indicadas de los antagonistas, o BWB solo como control. Las células fueron incubadas 10 min a 37 C y el pH fue ajustado a 8,5 con 1 M Tris. Luego de 30 minutos se tomaron alícuotas para determinar el porcentaje de reacción acrosomal. Los datos están expresados como % RAN (ver Materiales y Métodos) y son representativos de tres experimentos. Cada punto representa la media de ensayos duplicados.

#### 4. DISCUSION

En base a la hipótesis de que los oligosacáridos presentes en la zona pellucida inducen la reacción acrosomal por agregamiento de receptores específicos en la superficie del espermatozoide, se estudió la participación de varios residuos glicosilados en la reacción acrosomal de espermatozoides humanos.

Los monosacáridos no fueron capaces de inducir la reacción acrosomal, mientras que, cuando están covalentemente unidos a una macromolécula, estimularon este proceso. De las siete neoglicoproteínas testeadas, solo BSA-GlcNAc y BSA-Man fueron capaces de inducir la reacción acrosomal a una concentración de 1 µg/ml. Estos resultados sugieren la participación de residuos manosa y N-acetilglucosamina en la inducción de la exocitosis acrosomal en humanos.

**Figura 36.** Efecto de la toxina de Pertussis en la reacción acrosomal inducida por depolarización. Los espermatozoides fueron capacitados en presencia o ausencia de 0,5  $\mu\text{g/ml}$  PTx y luego transferidos a BWW pH 8,5 (8,5); BWW modificado (80 mM  $\text{K}^+$ , pH 8,5) ( $\text{K}^+$ ); o BWW (control). Las células fueron incubadas por 30 min a 37 C y luego se tomaron alícuotas para determinar el porcentaje de reacción acrosomal. Los resultados son representativos de tres experimentos similares. Las barras representan la media  $\pm$  error de ensayos por duplicado.



Existen evidencias que sugieren que los residuos manosa son esenciales o están estrictamente relacionados con el sitio receptor del espermatozoide para zona pellucida humana [216,301]. La expresión de estos sitios receptores para manosa en la superficie del espermatozoide fue detectada con una neoglicoproteína manosilada y marcada con fluoresceína, y está asociada con la capacidad de unión a zona humana en fertilización in vitro [18]. Por lo tanto, sitios receptores para residuos D-manosa serían posibles determinantes del reconocimiento de gametas y fertilización en humanos. Los resultados obtenidos con BSA-Man induciendo la reacción acrosomal estarían de acuerdo con estas observaciones.

La unión de espermatozoides humanos a la zona pellucida, así como la reacción acrosomal inducida por zona son significativamente inhibidas por fucoidin, un polímero de fucosa [199,227,228], sugiriendo que estos residuos están involucrados en la interacción entre los gametas. Sin embargo, nuestros resultados con BSA-Fuc muestran que se necesitan altas concentraciones de esta neoglicoproteína para

estimular la reacción acrosomal. Otras neoglicoproteínas, como BSA-Gal, BSA-Glc, BSA-GalNAc y BSA-Lac no presentaron capacidad de inducir la reacción acrosomal.

La inducción de la reacción acrosomal por BSA-GlcNAc fue eficientemente inhibida por N-acetilglucosamina. Resultados similares fueron obtenidos con manosa en respecto a la inducción por BSA-Man. Los ensayos de inhibición usando monosacáridos indican que BSA-GlcNAc y BSA-Man actúan específicamente a través de sus propios sitios de unión, y no se observó un efecto sinérgico entre las dos neoglicoproteínas. Estos resultados tienen dos explicaciones posibles: A) ambos agentes poseen sitios de unión independientes en el espermatozoide, o B) un único receptor posee sitios de unión tanto para N-acetilglucosamina como para manosa. Por lo tanto, los espermatozoides humanos presentan sitios de unión para N-acetilglucosamina y manosa, los cuales están involucrados en el mecanismo de inducción de la exocitosis acrosomal.

Los estudios de inhibición usando enzimas proveen mas información tanto sobre especificidad de los ligandos como sobre su posible participación en la reacción acrosomal inducida por neoglicoproteínas.  $\beta$ NAG soluble, así como algunos de sus ligandos específicos, inhibieron la inducción por BSA-GlcNAc, mientras que no se logró efecto con otras enzimas como  $\alpha$ -manosidasa y galactosiltransferasa.

La  $\alpha$ -Manosidasa pudo inhibir parcialmente el efecto de BSA-Man sobre la reacción acrosomal, sugiriendo una posible participación de esta enzima. Bajo las mismas condiciones,  $\beta$ NAG presentó un efecto inhibitorio similar a  $\alpha$ -manosidasa. Sin embargo, la  $\alpha$ -manosidasa "neutra" que ha sido descrita en membranas de espermatozoides [315,317] y que podría estar involucrada en estos mecanismos, presenta distintas características que la típica  $\alpha$ -manosidasa lisosomal empleada en estos ensayos, como por ejemplo, distinta especificidad por oligosacáridos de alto contenido en manosa [3].

Se requiere capacitación in vivo o in vitro para la inducción fisiológica de la reacción acrosomal. El ionóforo de calcio desencadena la reacción acrosomal a través de un efecto farmacológico de permeabilización de la célula al calcio, independiente del proceso de capacitación, y sin involucrar receptores de membrana. En este caso la respuesta máxima se alcanza casi instantáneamente (aproximadamente 2 min). La inducción por BSA-GlcNAc, mientras tanto, es efectiva solo en espermatozoides capacitados, y presenta cinética similar a lo reportado para inducción por zona, es decir entre 20 e 30 minutos [66]. Si los espermatozoides son capacitados en presencia de calcio, y este ion es quelado cuando se adiciona BSA-GlcNAc, no se observa inducción de la reacción acrosomal. Esto muestra que la inducción por neoglicoproteína

requiere influjo de calcio extracelular similar al descrito para la inducción fisiológica.

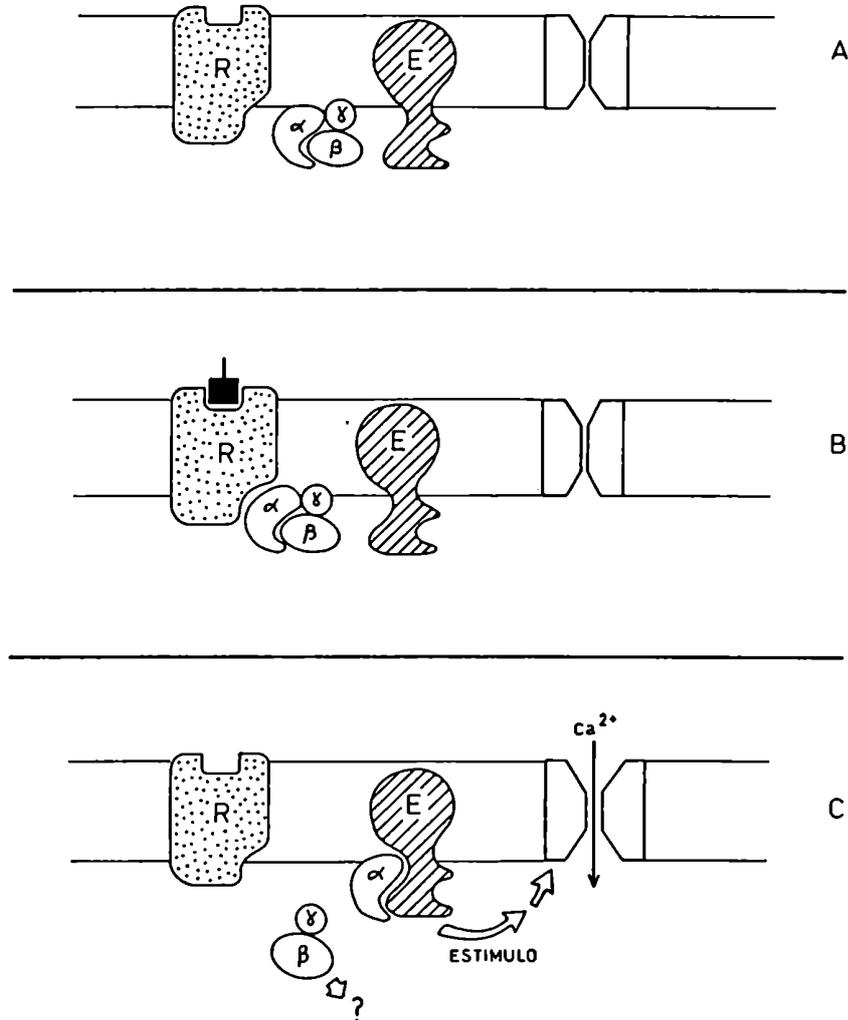
Los espermatozoides de mamíferos poseen proteínas G que están involucradas en la vía de transducción de señales de la inducción de la reacción acrosomal por zona pellucida [94,167]. Espermatozoides incubados con zona pellucida muestran aumentada la actividad de GTPasa y unión a GTP $\gamma$ S, efectos que son inhibidos por tratamiento con toxina de Pertussis [322,329]. El tratamiento con esta toxina también inhibe la inducción de la reacción acrosomal por zona pellucida [94,105,182].

Los resultados expuestos indican que la exocitosis acrosomal inducida por neoglicoproteínas ocurre por la misma vía de transducción de señales que la inducida por zona pellucida. Tanto el efecto de BSA-GlcNAc como de BSA-Man, fueron bloqueados cuando los espermatozoides fueron pretratados con toxina de Pertussis, lo que sugiere la presencia de una proteína regulat6ria de tipo Gi. Adem6s, la reacci6n acrosomal inducida por neoglicoproteínas es inhibida por dosis de esta toxina similares a las concentraciones usadas para inhibir el efecto de la zona [182]. El hecho de que la toxina de Pertussis no inhiba la inducci6n de la reacci6n acrosomal por ion6foro descarta una acci6n inhibitoria sobre los eventos post transduccionales como captaci6n de Ca<sup>2+</sup> o la fusi6n de membranas. Por otro lado, el tratamiento con toxina de c6lera no afecta la inducci6n de la reacci6n acrosomal por los agentes testeados, de acuerdo con la ausencia de prote6nas G que pueden servir

como sustrato para ADP-ribosilación por esta toxina en espermatozoides de mamíferos [19,138,168].

Estudios utilizando antagonistas para canales de calcio voltaje dependiente dan evidencias de que este tipo de canal tendría un importante papel en espermatozoides de mamíferos. Estos canales estarían involucrados en la maduración [229], capacitación [11,232] y reacción acrosomal [103] de espermatozoides. El tratamiento de espermatozoides humanos con los antagonistas diltiazem o verapamil no bloquean el influjo de calcio [153], indicando que canales de calcio voltaje dependiente no estarían involucrados en el mecanismo de control del calcio intracelular en condiciones basales. Se han purificado canales iónicos voltaje dependiente de espermatozoides humanos [343] que presentan mayor selectividad para cationes monovalentes, sin embargo también son permeables a aniones y iones divalentes. Se presentan aquí evidencias que respaldan la presencia de este tipo de canales en espermatozoides humanos. Se demostró que se puede inducir reacción acrosomal por depolarización de membrana, y que el pretratamiento con antagonistas de calcio puede inhibir este efecto. Nuestros resultados también muestran que la vía entre activación de estos canales y la reacción acrosomal no es sensible a toxina de Pertussis, de acuerdo con lo establecido en otras especies [103]. Estos resultados sugieren que la activación de VDCC por depolarización evitan el paso regulatorio modulado por proteína G que estaría acoplada a los sitios de unión a N-acetilglucosamina y manosa, o en otras palabras la proteína G estaría "upstream" a VDCC en esta vía. En la figura 37, se muestra posible

modelo para este mecanismo, basado en [94,103,137] y resultados presentados aquí.



**Figura 37.** Modelo para el mecanismo de transducción de señales de la reacción acrosomal. (a) La proteína G esta como heterotrímero; el receptor para oligosacáridos esta desocupado. (b) La unión de oligosacáridos a los receptores causaría el agregamiento de estos, que interactuarían con la proteína G, causando la disociación de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta\gamma$  (c) La subunidad  $\alpha$  interactuaría con un efector que provocaría la activación de canales de calcio voltaje dependiente, resultando en el influjo de calcio. En este mismo sistema, el complejo subunidad  $\beta\gamma$  libre también podría interactuar directamente con el efector, o actuar independientemente sobre un distinto efecto, y de esta manera participar en la regulación de este proceso.

Los canales iónicos son modulados por proteínas G [43,258], y tanto subunidades  $\alpha$  [201] como  $\beta\gamma$  [190,243] han sido descritas en su regulación. Canales de calcio son activados durante la reacción acrosomal, inducida por la cubierta vitelina en erizos de mar [123], así como inducida por zona en mamíferos [103]. Sin embargo, los mecanismos de regulación de canales de calcio por proteínas G no está totalmente elucidado, y la inducción fisiológica de la reacción acrosomal puede estar mediada por activación indirecta de canales de calcio por proteínas G.

Como se discutió previamente, la inducción por BSA-GlcNAc requiere calcio, es efectiva solo en espermatozoides capacitados y presenta cinética similar a la reportada para inducción por zona. Estos resultados, en conjunto con los de inhibición de la reacción acrosomal inducida por neoglicoproteínas por toxina de Pertussis y antagonistas de canales de calcio indican el significado fisiológico de este proceso.

**Discusión**

**Final**

---

---

## DISCUSION FINAL

Los complejos entre proteínas y carbohidratos complementarios están involucrados en el reconocimiento celular [248, 273, 274, 283, 328]. El agregamiento de receptores en respuesta a estímulos extracelulares causa la activación de vías de señales intracelulares, similar a los cambios asociados a la reacción acrosomal, como incremento en el pH intracelular y incorporación de calcio [11, 105, 150, 152]. La exocitosis acrosomal en respuesta a neoglicoproteínas estaría mediada por el agrupamiento de los sitios de unión en la superficie del espermatozoide, dado que los monosacáridos solo son efectivos cuando están asociados a una macromolécula. El efecto de BSA-GlcNAc en la reacción acrosomal, y la inhibición de este efecto por ligandos específicos de la  $\beta$ NAG así como por  $\beta$ NAG soluble, permiten considerar que esta enzima puede estar involucrada en la inducción de la reacción acrosomal en humanos.

El agregamiento de receptores para oligosacáridos de la zona pellucida ha sido propuesto como mecanismo de inducción de la reacción acrosomal. Se ha demostrado que cuando espermatozoides capacitados de ratón son tratados sucesivamente con (a) glicopéptidos de ZP3, (b) fragmentos Fab anti-ZP3, y (c) anti-IgG, se observa que la mayoría de las células sufren la reacción acrosomal después de la adición del segundo anticuerpo, que agregaría los sitios de unión [187]. También en el ratón, se demostró que el tratamiento de los espermatozoides con anti-

galactosiltransferasa bloquea la interacción entre gametas y induce la reacción acrosomal (194). Se mostró que otros inhibidores de la unión espermatozoide-ovocito que perturban la actividad de *galactosiltransferasa* como UDP-galactosa, N-acetilglucosamina o Fab anti-galactosiltransferasa no inducen la exocitosis acrosomal. Estos datos, juntamente con el hecho de que el tratamiento con Fab mas anti-IgG induce la reacción acrosomal [194], estarían reforzando el agregamiento de receptores como mecanismo de inducción. Por otro lado, se ha caracterizado un polipéptido de vesícula seminal (SVI) que actúa como inhibidor de proteasa y bloquea interacción espermatozoide-ovocito y la reacción acrosomal inducida por zona pellucida [33]; tratando los espermatozoides con SVI mas anti-SVI se logra inducir la reacción acrosomal. En espermatozoides humanos, nuestros resultados indican que el mecanismo de inducción de la reacción acrosomal por neoglicoproteínas también sería por agregamiento de receptores visto que se necesita que los azúcares estén unidos a una macromolécula para inducir este efecto.

Enzimas como la  $\alpha$ -manosidasa en rata [316], ratón [59] y humanos [317]; fucosiltransferasa en ratón [49]; acrosina en porcino [307, 308]; y  $\beta$ -galactosidasa en conejo [222] han sido propuestas como sitio complementario para las glicoproteína de la zona pellucida en la superficie del espermatozoide. Más específicamente, en el ratón,  $\beta$ -1,4-galactosiltransferasa fue identificada como sitio complementario para la glicoproteína ZP3 y su agregamiento en la superficie del espermatozoide desencadenaría la reacción acrosomal [209]. Por otro lado, las

glicoproteína ZP3 y ZP2 de la zona pellucida de ratón presentan alto contenido de residuos manosa en sus cadenas de oligosacáridos [313]. Se ha demostrado que la inhibición de la  $\alpha$ -manosidasa presente en la superficie de espermatozoides de ratón lleva al bloqueo de la unión entre las gametas [59], sugiriendo que esta enzima también participaría en el reconocimiento espermatozoide-ovocito en esta especie. En un trabajo previo [17], Benau & Storey obtienen evidencias de que por lo menos dos sitios de unión para la zona pellucida de ratón en espermatozoides homólogos son independientes en la unión a ligandos específicos de la zona. Estos sitios son: un sitio con actividad de galactosiltransferasa, y un sitio sensible a inhibidores de tripsina. Estos datos estarían indicando que distintos sitios participan el reconocimiento entre las gametas, y posiblemente la "combinación" de estos daría mayor especificidad.

La importancia de los residuos N-acetilglucosamina en fertilización deriva de las siguientes observaciones. Se ha detectado un incremento en los residuos N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina y galactosa en la zona pellucida durante la maduración de ovocitos de hámster [161, 257]. El tratamiento de espermatozoides con este azúcar causa la completa inhibición de la unión espermatozoide-ovocito en esta especie [1, 172]. Finalmente, la cubierta vitelina de ovocitos de ascidias (equivalente a la zona pellucida de mamíferos) está compuesta por dos glicoproteína principales que presentan 86% N-acetilglucosamina/N-acetilgalactosamina en su composición de carbohidratos [188]. La  $\beta$ NAG del espermatozoide ha sido descrita como indispensable para la

fertilización en ascidias [119] por mediar la interacción con la cubierta vitelina.

Considerando los resultados presentados, y que varias enzimas han sido propuestas como agentes esenciales en el reconocimiento entre gametas, es posible considerar la participación de la  $\beta$ NAG en la interacción espermatozoide-ovocito en humanos.

# **References**

## REFERENCIAS

1. Ahuja KK (1982) Fertilization studies in the hamster. The role of cell surface carbohydrates. *Exp. Cell Res.* 140, 353-362
2. Ahuja KK (1985) Carbohydrate determinants involved in mammalian fertilization. *Am. J. Anat.* 174, 207-223
3. Al Daher S, De Gasperi R, Daniel P, Hirani S, Warren C, and Winchester B (1992) Substrate specificity of human liver neutral  $\alpha$ -mannosidase. *Biochem. J.* 286, 47-53
4. Allison A, and Cand Hartree EF (1970) Lysosomal enzymes in the acrosome and their possible role in fertilization. *J. Reprod. Fertil.* 21, 501-515
5. Anand SR, Kaur SP, and Chaudhry PS (1977) Distribution of  $\beta$ -N-Acetylglucosaminidase, Hyaluronoglucosaminidase and acrosin in buffalo and goat spermatozoa. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 358, 685-688
6. Austin CR (1952) The "capacitation" of the mammalian sperm. *Nature* 170, 326
7. Austin CR (1967) Capacitation of spermatozoa. *Int. J. Fertil.* 12, 25-31
8. Austin CR (1985) Sperm maturation in the male and female genital tracts. In: *Biology of Fertilization*, Vol 2 (Metz CB and Monroy A, eds) pp. 121-155, Academic Press, New York
9. Austin CR, and Bishop MWH (1958) Some features of the acrosome perforatorium in mammalian spermatozoa. *Proc. R. Soc. Lond. (Biol.)* 149, 234-240

10. Babcock DF, Bosma MM, Battaglia DE, and Darszon A (1992) Early persistent activation of sperm K<sup>+</sup> channels by the egg peptide speract. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6001-6005
11. Babcock DF, and Pfeiffer DR (1987) Independent elevation of cytosolic [Ca<sup>2+</sup>] and pH of mammalian sperm by voltage-dependent and pH-sensitive mechanisms. *J. Biol. Chem.* 262, 15041-15047
12. Barros C, Bedford JM, Franklin LE, and Austin CR (1967) Membrane vesiculation as a feature of the mammalian acrosome reaction. *J. Cell Biol.* 34, C1-C5
13. Bedford JM (1975) Maturation, transport and fate of the spermatozoa in the epididymis. In: *Handbook of Physiology* (Hamilton DW and Greep RO, eds) pp. 303-317, Am. Physiol. Soc., Washington, D.C.
14. Bedford JM, Calvin H, and Cooper GW (1973) The maturation of spermatozoa in the human epididymis. *J. Reprod. Fertil.* 18 (suppl), 199-213
15. Bedford JM (1970) Sperm capacitation and fertilization in mammals. *Biol. Reprod.* 2, 128-158
16. Bellve AR, and O'Brien DA (1983) The mammalian spermatozoa: Structure and temporal assembly. In: *Mechanism and Control of Animal Fertilization* (Hartmann JF, ed) pp. 55-137, Academic Press, New York
17. Benau D A, and Storey BT (1988) Relationship between two types of mouse sperm surface sites that mediate binding of sperm to the zona pellucida. *Biol. Reprod.* 39, 235-245

- 18.** Benoff S, Cooper GW, Hurley I, Napolitano B, Rosenfeld DL, Scholl GM, and Hershlag A (1993) Human sperm fertilizing potential in vitro is correlated with differential expression of a head-specific mannose-ligand receptor. *Fertil. Steril.* 59, 854-862
- 19.** Bentley JK, Garbers DL, Domino SE, Noland TD, and Van Dop C (1986) Spermatozoa contain a guanine nucleotide-binding protein ADP-ribosylated by pertussis toxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 138, 728-734
- 20.** Bentley JK, Khatra AS, and Garbers DL (1991) Receptor-mediated activation of detergent-solubilized guanylate cyclase. *Biol. Reprod.* 39, 639
- 21.** Bentley JK, Shimomura H, and Garbers DL (1986) Retention of a functional resact receptor in isolated sperm plasma membranes. *Cell* 45, 281
- 22.** Bentley JK, Tubb DJ, and Garbers DL (1986) Receptor-mediated activation of spermatozoa guanylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 261, 14859
- 23.** Berger T, and Clegg ED (1983) Adenylate cyclase activity in porcine sperm in response to female reproductive tract secretions. *Gamete Res.* 7, 169-177
- 24.** Bernal A, Torres J, Reyes A, and Rosado, A (1980) Presence and regional distribution of sialyl transferase in the epididymis of the rat. *Biol. Reprod.* 23, 290-293
- 25.** Biggers JD, Whitten WK, and Whittingham DG (1971) The culture of mouse embryos in vitro. In: *Methods in Mammalian Embryology* (Daniel JD, ed) pp. 86-116, Freeman, San Francisco

- 26.** Blackmore PF, Beebe SJ, Danforth DR, and Alexander N (1990) Progesterone and 17  $\alpha$ -hydroxyprogesterone. Novel stimulators of calcium influx in human sperm. *J. Biol. Chem.* 265, 1376-1380
- 27.** Bleil JD, and Wassarman PM (1980) Structure and function of the zona pellucida: identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Dev. Biol.* 76, 185-203
- 28.** Bleil JD, and Wassarman PM (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
- 29.** Bleil JD, and Wassarman PM (1986) Autoradiographic visualization of the mouse egg's sperm receptor bound to sperm. *J. Cell Biol.* 102, 1363
- 30.** Bleil JD, and Wassarman PM (1988) Galactose at the nonreducing terminus of O-linked oligosaccharides of mouse egg zona pellucida glycoprotein ZP3 is essential for the glycoprotein's sperm receptor activity. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 85, 6778-6782
- 31.** Boatman DE, and Bavister BD (1984) Stimulation of rhesus monkey capacitation by cyclic nucleotides mediators. *J. Reprod. Fertil.* 71, 357-366
- 32.** Boell EJ (1985) Oxygen consumption of mouse sperm and its relationship to capacitation. *J. Exp. Zool.* 234, 105-116
- 33.** Boettger-Tong H, Aarons D, Biegler B, Lee T, and Poirier GR (1992) Competition between zonae pellucidae and a proteinase inhibitor for sperm binding. *Biol. Reprod.* 47, 716-722

- 34.** Bordier C (1981) Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J. Biol. Chem.* 256, 1604-1607
- 35.** Bradley MP, and Forrester IT (1980) A  $[Ca^{2+} + Mg^{2+}]$ -ATPase and active  $Ca^{2+}$  transport in the plasma membrane isolated from ram sperm flagella. *Cell Calcium* 1, 381-390
- 36.** Bradley MP, and Forrester IT (1980) A sodium-calcium exchange mechanism in plasma membrane vesicles isolated from ram sperm flagella. *FEBS Lett.* 121, 15-18
- 37.** Breitbart H, Darshan R, and Rubinstein S (1984) Evidence for the presence of ATP-dependent calcium pump and ATPase activities in bull sperm head membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122, 479-484
- 38.** Breitbart H, Stern B, and Rubinstein S (1983) Calcium transport and  $Ca^{2+}$ -ATPase activity in ram sperm plasma vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 728, 349-355
- 39.** Brooks DE (1988) Secretion of proteins and glycoproteins by the rat epididymis: Regional differences, androgen dependence, and effects of protease inhibitors, procaine and tunicamicin. *Biol. Reprod.* 25, 1099-1117
- 40.** Brooks DE (1979) Biochemical environment of sperm maturation. In: *The Spermatozoa* (Fawcett DW and Bedford JM, eds) pp. 23-34, Urban and Schwarzenberg, Baltimore
- 41.** Brooks DE, and Higgins SJ (1980) Characterization and androgen dependence of proteins associated with luminal fluid and spermatozoa in the rat epididymis. *J. Reprod. Fertil.* 59, 363-375

**42.** Brooks DE, Means AR, Wright EJ, Singh SP, and Tiver KK (1986) Molecular cloning of the cDNA for two major androgen-dependent secretory proteins of 18.5 kilodaltons synthesized by the rat epididymis. *J. Biol. Chem.* 261, 4956-4961

**43.** Brown A, and Birnbaumer L (1990) Ionic channels and their regulation by G-protein subunits. *Annu. Rev. Physiol.* 52, 197-213

**44.** Bruns KA, and Casillas ER (1989) The metabolism of acetylcarnitine and acetate by bovine and hamster epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod.* 41, 218-226

**45.** Bullock S, and Winchester B (1973) The N-Acetylhexosaminidase components of the ram testis and epididymis. *Biochem. J.* 133, 593-599

**46.** Calvin HI, and Bedford JM (1971) Formation of disulfide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *J. Reprod. Fertil.* 13, 65-75

**47.** Calvo L, Dennison-Lagos L, Banks SM, Fugger EF, and Sherins RJ (1993) Chemical composition and protein source in the capacitation medium significantly affect the ability of human spermatozoa to undergo follicular fluid induced acrosome reaction. *Hum. Reprod.* 8, 575-580

**48.** Cameo MS, and Blaquier JA (1976) Androgen-controlled specific proteins in rat epididymis. *J. Endocrinol.* 69, 47-55

**49.** Cardullo RA, Armant DR, and Millette CF (1989) Characterization of fucosyltransferase activity during mouse spermatogenesis: evidence for a cell surface fucosyltransferase. *Biochemistry-USA* 28, 1611-1617

50. Chang MC (1951) Fertilizing capacity of spermatozoa deposited in fallopian tubes. *Nature* 168, 997-998
51. Chang MC (1984) The meaning of sperm capacitation. *J. Androl.* 5, 45-50
52. Chaplin MF (1986) Monosaccharides. In: *Carbohydrate Analysis: a practical approach* (Chaplin MF and Kennedy JF, eds) pp. 1-36, IRL Press, Oxford
53. Cherr GN, Lambert H, Meizel S, and Katz DF (1986) In vitro studies of the golden hamster sperm acrosome reaction: completion on the zona pellucida and induction by homologous soluble zonae pellucidae. *Dev. Biol.* 114, 119
54. Christen R, Schackmann RW, and Shapiro BM (1986) Ionic regulation of sea urchin sperm motility, metabolism and fertilizing capacity. *J. Physiol.* 379, 347-365
55. Clegg EG (1983) Mechanisms of mammalian sperm capacitation. In: *Mechanism and Control of Animal Fertilization* (Hartmann JF, ed) pp. 177-212, Academic Press, New York
56. Collado ML, Castro G, and Hicks JJ (1979) Effect of spermatozoa upon carbonyl anhydrase activity of rabbit endometrium. *Biol. Reprod.* 20, 747-750
57. Conchie J, and Mann T (1957) Glycosidases in mammalian sperm and seminal plasma. *Nature* 179, 1190-1191
58. Cooper TG (1986) *The epididymis, sperm maturation and fertilization.* Springer-Verlag, Berlin
59. Cornwall GA, Tulsiani DRP, and Orgebin-Crist MC (1991) Inhibition of the mouse sperm surface  $\alpha$ -D-mannosidase inhibits sperm-egg binding in vitro. *Biol. Reprod.* 44, 913-921

59. Cornwall GA, Tulsiani DRP, and Orgebin-Crist MC (1991) Inhibition of the mouse sperm surface  $\alpha$ -D-mannosidase inhibits sperm-egg binding in vitro. *Biol. Reprod.* 44, 913-921
60. Coronel CE, Agustin JS, and Lardy HA (1988) Identification and partial characterization of caltrin-like proteins in the reproductive tract of the guinea pig. *Biol. Reprod.* 38, 713-722
61. Coronel CE, and Lardy HA (1987) Characterization of  $Ca^{2+}$  uptake by guinea pig epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod.* 37, 1097-1107
62. Courot M (1981) Transport and maturation of spermatozoa. *Prog.Reprod. Biol.* 8, 67-79
63. Cox T, and Peterson RN (1989) Identification of calcium conducting channels in isolated boar sperm plasma membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161, 162-168
64. Cross NL (1993) Multiple effects of seminal plasma on the acrosome reaction of human sperm. *Mol. Reprod. Dev.* 35, 316-323
65. Cross NL, Morales P, Overstreet JW, and Hanson FW (1986) Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Gamete Res.* 15, 213-226
66. Cross NL, Morales P, Overstreet JW, and Hanson FW (1988) Induction of acrosome reactions by the human zona pellucida. *Biol. Reprod.* 38, 235-242
67. Cross NL, and Overstreet JW (1987) Glycoconjugates of the human sperm surface: Distribution and alterations that accompany capacitation in vitro. *Gamete Res.* 16, 23-35
68. Crozet N (1984) Ultrastructural Aspects of In Vivo Fertilization in the Cow. *Gamete Res.* 10, 241-251

- 69.** Crozet N, and Dumont M (1984) The Site of the Acrosome Reaction During In Vivo Penetration of the Sheep Oocyte. *Gamete Res.* 10, 97-105
- 70.** Cuasnicu PS, Gonzalez Echeverria MF, Piazza AD, Pineiro L, and Blaquier JA (1984) Addition of androgens to cultured hamster epididymis increases zona recognition by immature spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 70, 541-547
- 71.** Cummins JM, and Yanagimachi R (1982) Sperm-egg ratio and the site of the acrosome reaction during in vivo fertilization in the hamster. *Gamete Res.* 5, 239
- 72.** D'Addario DA, Turner TT, and Howards SS (1980) Effect of vasectomy on the osmolarity of hamster testicular and epididymal intraluminal fluid. *J. Androl.* 1, 167-170
- 73.** Dacheux JL, Dacheux F, and Paquignon M (1989) Changes in sperm surface membrane and luminal protein fluid content during epididymal transit in the boar. *Biol. Reprod.* 40, 635-641
- 74.** Dangott LJ, and Garbers DL (1984) Identification and partial characterization of the receptor for speract. *J. Biol. Chem.* 259, 13712
- 75.** Davis BK (1978) Inhibition of fertilizing capacity in mammalian spermatozoa by natural and synthetic vesicles. *Symp. Pharmac. Eff. of Lipids* 5, 145-157
- 76.** Davis BK (1980) Interaction of lipids with the plasma membrane of sperm cells. I. The antifertilization action of cholesterol. *Arch. Androl.* 5, 249-254
- 77.** Davis BK (1981) Timing of fertilization in mammals: Sperm cholesterol phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 7560-7564

**78.** Davis BK, Byrne R, Bidigian K (1980) Studies on the mechanisms of capacitation: albumin-mediated changes in plasma membrane lipids during in vitro capacitation of rat sperm cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 1546-1550

**79.** deDuve C, Pressman BC, Gianetto R, Wattiaux R, and Appelmans F (1955) Tissue fractionation studies: intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissue. Biochem. J. 60, 604-617

**80.** Delgado NM, Reyes R, Carranco A, Huacuja L, Merchant H, and Rosado A (1990) Glycosaminoglycan-sulfate as plasma membrane component of pig spermatozoa. Arch. Androl. 25, 121-129

**81.** Delgado NM, Reyes R, Huacuja L, Merchant H, and Rosado A (1982) Heparin binding sites in the human spermatozoa membrane. Arch. Androl. 8, 87-95

**82.** Delpech S, Hamamah S, Pisselet C, and Courot M (1988) Differential localization of glycoconjugates having affinity for concanavalin A on the surface of the sperm head in the testis, the epididymis, and the ejaculate of the ram. J. Exp. Zool. 245, 59

**83.** DeMayo FJ, Mizoguchi H, and Dukelow WR (1980) Fertilization of squirrel monkey and hamster ova in the rabbit oviduct. Science 1469, 1468-1469

**84.** Detmers PA, Wright SD, Olsen E, Kimball B, and Cohn ZA (1987) Aggregation of complement receptor on human neutrophils in the absence of ligand. J. Cell Biol. 105, 1137-1145

**85.** Didion BA, Dobrinsky JR, Giles JR, and Graves CN (1989) Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. Gamete Res. 22, 51-59

**86.** Dravland JE, Llanos MN, Munn RJ, and Meizel S (1984) Evidence for the involvement of a sperm trypsinlike enzyme in the membrane events of the hamster sperm acrosome reaction. *J. Exp. Zool.* 232, 117-128

**87.** Duncan AE, and Fraser LR(1993) Cyclic AMP-dependent phosphorylation of epididymal mouse sperm proteins during capacitation in vitro: Identification of an Mr 95 000 phosphotyrosine-containing protein. *J. Reprod. Fertil.* 97, 287-299

**88.** East IJ, and Dean J (1984) Monoclonal antibodies as probes of the distribution of ZP-2, the major sulfated glycoprotein of the murine zona pellucida. *J. Cell Biol.* 98, 795-800

**89.** Eberspaecher U, Gerwien J, Habenicht UF, Schleuning WD, and Donner P (1991) Activation and subsequent degradation of proacrosin is mediated by zona pellucida glycoproteins, negatively charged polysaccharides, and DNA. *Mol. Reprod. Dev.* 30, 164-170

**90.** Eckstein DJ, and Shur BD (1992) Cell surface  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase is associated with the detergent-insoluble cytoskeleton on migrating mesenchymal cells. *Exp. Cell Res.* 201, 83-90

**91.** Eddy EM (1988) The spermatozoon. In: *Physiology of Reproduction* (Knobil E and Neill JD, eds) pp. 27-68, Raven Press, New York

**92.** Eddy EM, Vernon RB, Muller CH, Hahnel AC, and Fenderson BA (1985) Immunodissection of sperm surface modifications during epididymal maturation. *Am. J. Anat.* 174, 225-237

93. Ehrenwald E, Parks JE, and Foote RH (1988) Cholesterol efflux from bovine sperm. I. Induction of the acrosome reaction with lysophosphatidylcholine after reducing sperm cholesterol. *Gamete Res.* 20, 145
94. Endo Y, Lee M, and Kopf GS (1988) Islet-activating protein-sensitive site in mouse sperm that is involved in the zona pellucida-induced acrosome reaction. *Dev. Biol.* 129, 12-25
95. Farlin ME, Jasko DJ, Graham JK, and Squires EL (1992) Assessment of *Pisum sativum* agglutinin in identifying acrosomal damage in stallion spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 32, 23-27
96. Farooqui AA, and Srivastava PN (1980) Isolation of  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase from rabbit semen and its role in fertilization. *Biochem. J.* 191, 827-834
97. Fawcett DW (1975) The mammalian spermatozoon: a review. *Dev. Biol.* 44, 394-436
98. Fayerer-Hosken RA, Brackett BG, and Brown LM (1987) Reversible inhibition of rabbit sperm-fertilizing ability by cholesterol sulfate. *Biol. Reprod.* 36, 878-883
99. Fayerer-Hosken RA, Caudle AB, and Shur BD (1991) Galactosyltransferase activity is restricted to the plasma membranes of equine and bovine sperm. *Mol. Reprod. Dev.* 28, 74-78
100. Fichorova R, and Anderson DJ (1991) Use of sperm viability and acrosomal status assays in combination with immunofluorescence technique to ascertain surface expression of sperm antigens. *J. Reprod. Immunol.* 20, 1-13
101. Flechon JE (1985) Sperm surface changes during the acrosome reaction as observed by freeze-fracture. *Am. J. Anat.* 174, 239-248

**102.** Flechon JE, Harrison RAP, Flechon B, and Escaig J (1986) Membrane fusion events in the  $\text{Ca}^{2+}$  /ionophore-induced acrosome reaction of ram spermatozoa. *J. Cell Sci.* 81, 43-63

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

**104.** Florman HM, and First NL (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, 453-464

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

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

**107.** Foster JA, and Herr JC (1992) Interactions of human sperm acrosomal protein SP-10 with the acrosomal membranes. *Biol. Reprod.* 46, 981-990

**108.** Fourie MH, Du Toit D, Bornman MS, Van der Merwe MP, and Du Plessis DJ (1991)  $\alpha$ -Glucosidase, sperm ATP concentrations, and epididymal function. *Arch. Androl.* 26, 139-141

**109.** Fournier-Delpech S, Courtens JL, Pisselet CL, Delaleu B, and Courot M (1982) Acquisition of zona binding by ram spermatozoa during epididymal passage, as revealed by interaction with rat oocytes. *Gamete Res.* 5, 403-408

- 110.** Fournier-Delpech S, Hamamah C, Tananis-Anthony C, Courot M, and Orgebin-Crist MC (1984) Hormonal regulation of zona-binding ability and fertilizing ability of rat epididymal spermatozoa. *Gamete Res.* 9, 21-30
- 111.** Fraser LR (1981) Dibutyryl cyclic AMP decreases capacitation time in vitro in mouse spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 62, 63-72
- 112.** Friend DS (1977) The organization of the spermatozoal membrane. In: *Immunobiology of Gametes* (Edidin M and Johnson MH, eds) pp. 5, Cambridge University Press, Cambridge
- 113.** Gaddum-Rosse P (1985) Mammalian gamete interactions: What can be gained from observations on living eggs? *Am. J. Anat.* 173, 347-356
- 114.** Garbers DL, and Kopf GS (1980) The regulation of spermatozoa by calcium and cyclic nucleotides. *Adv. Cyclic Nuc. Res.* 13, 251-305
- 115.** Garbers DL, Tubb DJ, and Hyne RV (1982) A requirement of bicarbonate for Ca<sup>2+</sup>-induced elevations of cyclic AMP in guinea pig spermatozoa. *J. Biol. Chem.* 257, 8980
- 116.** Garty NB, and Salomon Y (1987) Stimulation of partially purified adenylate cyclase from bull sperm by bicarbonate. *FEBS Lett.* 218, 148-152
- 117.** Go KJ, and Wolf DP (1983) The role of sterols in sperm capacitation. *Adv. in Lipid Res.* 20, 317-330
- 118.** Go KJ, and Wolf DP (1985) Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation. *Biol. Reprod.* 32, 145-153

**119.** Godknecht A, and Honegger TG (1991) Isolation, characterization, and localization of a sperm-bound N-acetylglucosaminidase that is indispensable for fertilization in the ascidian, *Phallusia mammillata*. *Dev. Biol.* 143, 398-407

**120.** Goodpasture JC, Reddy JM, and Zaneveld LJD (1981) Acrosin, proacrosin, and acrosin inhibitor of guinea pig spermatozoa capacitated and acrosome-reacted in vitro. *Biol. Reprod.* 25, 44-55

**121.** Gordon LM and Mobley PW (1985) Membrane lipids, membrane fluidity, an enzyme activity. In: *Membrane Fluidity in Biology*. Vol. 4 (Aloia RC and Boggs JM, eds) pp. 1-49, Academic Press, Orlando

**122.** Guerin JF and Czyba JC (1987) Hydrolytic enzymes detected in fluid and spermatozoa from different portions of human epididymis. In: *Morphological Basis of Human Reproductive Function* (Spera G and deKretser DM, eds) pp. 197-200, Plenum Press, London

**123.** Guerrero A, and Darszon A (1989) Evidence for the activation of two different Ca<sup>2+</sup> channels during the egg jelly-induced acrosome reaction of sea urchin sperm. *J. Biol. Chem.* 264, 19593-19599

**124.** Gupta GS, and Kapur DK (1982) Purification and characterization of mouse testicular B-N-acetylglucosaminidase. *Ind. J. Biochem. Biophys.* 19, 37-40

**125.** Gwatkin RBL (1977) *Fertilization Mechanisms in Man and Mammals*. Plenum Press, New York

**126.** Gwatkin RBL, and Williams DT (1977) Receptor activity of the hamster and mouse solubilized zona pellucida before and after the zona reaction. *J. Reprod. Fertil.* 49, 55-59

**127.** Hall JC, and Killian GJ (1987) Changes in rat sperm membrane glycosidases activities and carbohydrate and protein contents associated with epididymal transit. *Biol. Reprod.* 36, 709-718

**128.** Hames BD (1981) An Introduction to Polyacrylamide Gel Electrophoresis. In: *Gel Electrophoresis of Proteins* (Hames BD and Rickwood D, eds) pp. 1-92, IRL Press, Oxford Washington DC

**129.** Hamilton DW (1980) UDP-galactose: N-acetylglucosamine galactosyltransferase in fluids from rat testis and epididymis. *Biol. Reprod.* 23, 377-385

**130.** Hamilton DW, and Fawcett DW (1970) In vitro synthesis of cholesterol and testosterone from acetate by rat epididymis and vas deferens. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 133, 693-695

**131.** Hamilton DW, and Gould RP (1980) Galactosyltransferase activity associated with rat epididymis. *Anatomical Record* 196, 71a

**132.** Handrow RR, Boehm SK, Lenz RW, Robinson JA, and Ax RL (1984) Specific binding of glycosaminoglycan 3H-heparine to bull, monkey and rabbit spermatozoa in vitro. *J. Androl.* 5, 51-63

**133.** Hansbrough JR, and Garbers DL (1981) Spermact: purification and characterization of a peptide associated with eggs that activates spermatozoa. *J. Biol. Chem.* 256, 2235

**134.** Hardy DM, Oda MN, Friend DS, and Huang TTF Jr.(1991) A mechanism for differential release of acrosomal enzymes during the acrosome reaction. *Biochem. J.* 275, 759-766

**135.** Harlow E and Lane D (1988) *Antibodies, a Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor

136. Helm G, Owman CH, Rosengren E, and Sjoberg NO (1982) Regional and cyclic variations in catecholamine concentrations of the human Fallopian tube. *Biol. Reprod.* 26, 553-558
137. Hepler JR, and Gilman AG (1992) G Proteins. *Trends Biochem. Sci.* 17, 383-387
138. Hildebrandt JD, Codina J, Tash JS, Kirchick HJ, Lipschultz L, Sekura RD, and Birnbaumer L (1985) The membrane-bound spermatozoal adenylyl cyclase system does not share coupling characteristics with somatic cell adenylyl cyclases. *Endocrinology* 116, 1357-1366
139. Holden CA, and Trounson AO (1991) Staining of the inner acrosomal membrane of human spermatozoa with concanavalin A lectin as an indicator of potential egg penetration ability. *Fertil. Steril.* 56, 967-974
140. Hooper NM and Bashir A (1991) Glycosyl-phosphatidylinositol-anchored membrane proteins can be distinguished from transmembrane polypeptide-anchored proteins by differential solubilization and temperature-induced phase separation in Triton X-114. *Biochem. J.* 280, 745-751
141. Hosey MM, and Lazdunski M (1988) Calcium channels: molecular pharmacology, structure and regulation. *J. Membrane Biol.* 104, 81-107
142. Hoshino K, Shimizu T, Sendai Y, Harumi T, and Suzuki N (1992) Differential effects of the egg jelly molecules FSG and SAP-I on elevation of intracellular Ca<sup>2+</sup> and pH in sea urchin spermatozoa. *Dev. Growth Diff.* 34, 403-411

- 143.** Hoskins D, Hall ML, and Musterman D (1975) Induction of motility in immature bovine spermatozoa by cAMP phosphodiesterase inhibitors and seminal plasma. *Biol. Reprod.* 13, 168-176
- 144.** Howards S, Lechene C, and Vigersky R (1979) The fluid environment of the maturing spermatozoa. In: *The Spermatozoa* (Fawcett DW and Bedford JM, eds) pp. 35-41, Urban and Schwarzenberg, Baltimore
- 145.** Huacuja L, Delgado NM, Merchant H, Pancardo RM, and Rosado A (1977) Cyclic AMP induced incorporation of  $^{33}\text{P}$  into human sperm membrane components. *Biol. Reprod.* 17, 89-96
- 146.** Huang TTF, and Yanagimachi R (1985) Inner acrosomal membrane of mammalian spermatozoa: Its properties and possible functions in fertilization. *Am. J. Anat.* 174, 249-268
- 147.** Hunter RHF (1984) Pre-ovulatory arrest and periovulatory redistribution of competent spermatozoa in the isthmus of the pig oviduct. *J. Reprod. Fertil.* 72, 203-211
- 148.** Hyne RV (1984) Bicarbonate- and calcium-dependent induction of rapid guinea pig sperm acrosome reactions by monovalent ionophores. *Biol. Reprod.* 31, 312-323
- 149.** Hyne RV, Edwards KP, and Smith JD (1985) Changes in guinea pig sperm intracellular sodium and potassium content during capacitation and treatment with monovalent ionophore. *Gamete Res.* 12, 65-73
- 150.** Hyne RV, and Garbers DL (1979) Calcium dependent elevation of adenosine 3',5'-monophosphate and induction of the acrosome reaction in guinea pig spermatozoa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 5699-5703

151. Ikari N, Yoshino H, Moses AC, and Flier JS (1988) Evidence that receptor aggregation may play a role in transmembrane signaling through the insulin-like growth factor-I receptor. *Mol. Endocrinol.* 2, 831-837
152. Imai A, Iida K, Matsunami K, Matsuda T, and Tamaya T (1990) Evidence for tight coupling of phospholipase activation and Ca<sup>2+</sup> influx during acrosome reaction of golden hamster spermatozoa. *Comp. Biochem. Physiol. [B]* 95B, 635-639
153. Irvine D S, and Aitken RJ (1986) Measurement of intracellular calcium in human spermatozoa. *Gamete Res.* 15, 57-711
154. Jauhiainen A, and Vanha-Perttula T (1986) B-N-Acetylglucosaminidase in the reproductive organs and seminal plasma of the bull. *J. Reprod. Fertil.* 76, 239-250
155. Johnson MH (1975) The macromolecular organization of membranes and its bearing on events leading up to fertilization. *J. Reprod. Fertil.* 44, 167-184
156. Jones R, and Brown CR (1982) Association of epididymal secretory proteins showing alpha-lactoalbumin-like activity with plasma membrane of rat spermatozoa. *Biochem. J.* 206, 161-164
157. Katz DF, Cherr GN, and Lambert H (1986) The evolution of hamster sperm motility during capacitation and interaction with the ovum vestments in vitro. *Gamete Res.* 14, 333
158. Katz DF, Drobnis EZ, and Overstreet JW (1989) Factors regulating mammalian sperm migration through the female reproductive tract and oocyte vestments. *Gamete Res.* 22, 443

**159.** Kazazoglou T, Schackmann RW, Fosset M, and Shapiro BM (1985) Calcium channel antagonists inhibit the acrosome reaction and bind to plasma membranes of sea urchin sperm. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 1462

**160.** Khar A, and Anand SR (1977) Purification and properties of B-N-acetylglucosaminidase from bull sperm. Biochim. Biophys. Acta 483, 141-151

**161.** Kimura J, Sato K, Tsukise A, and Okano M (1991) Appearance of lectin binding affinity to the zona pellucida during hamster oocyte maturation. Cell. Mol. Biol. 37, 623-629

**162.** Calvete JJ, Sanz L, and Topfer-Petersen E (1992) Carbohydrate-binding proteins involved in gamete interaction in the pig. In: Spermatogenesis-Fertilization-Contraception. Molecular, Cellular and Endocrine Events in Male Reproduction (Nieschlag E and Habenicht UF, eds) pp.395-417, Springer-Verlag, Berlin

**163.** Koehler, J. K.(1981) Lectins as probes of the spermatozoon surface. Arch. Androl. 6, 197-217

**164.** Kohane AC, Cameo MS, Pineiro L, Garberi JC, and Blaquier JA (1980) Distribution and site of production of specific proteins in the rat epididymis. Biol. Reprod. 23, 181-187

**165.** Kopecny V, Flechon JE, and Pivko J (1984) Binding of secreted glycoproteins to spermatozoa in the mammalian epididymis: A fine structure autoradiographic study. Anatomical Record 208, 197-206

**166.** Kopf GS, Tubb DJ, and Garbers DL (1979) Activation of sperm respiration by a low molecular weight egg factor and by 8-bromo-guanosine 3',5'-monophosphate. J. Biol. Chem. 254, 8554

**167.** Kopf GS, and Wilde MW (1990) Signal transduction processes leading to acrosomal exocytosis in mammalian spermatozoa. *Trends Endocrinol. Metab.* 1, 362-368

**168.** Kopf GS, Woolkalis MJ, and Gerton GL (1986) Evidence for a guanine nucleotide-binding regulatory protein in invertebrate and mammalian sperm. Identification by islet-activating protein-catalyzed ADP-ribosylation and immunochemical methods. *J. Biol. Chem.* 261, 7327-7331

**169.** Kornfeld S (1992) Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors. *Annu. Rev. Biochem.* 61, 307-330

**170.** Kovács A, and Foote RH (1992) Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. *Biotechnic Histochem.* 67, 119-124

**171.** Krzanowska H (1982) Toluidine blue staining reveals changes in chromatin stabilization of mouse spermatozoa during epididymal maturation and penetration of ova. *J. Reprod. Fertil.* 64, 97-101

**172.** Kumar GP, Laloraya M, Agrawal P, and Laloraya MM (1990) The involvement of surface sugars of mammalian spermatozoa in epididymal maturation and in vitro sperm-zona recognition. *Andrologia* 22, 184-194

**173.** Lacy BE, and Underhill CB (1987) The Hyaluronate Receptor Is Associated with Actin Filaments. *J. Cell Biol.* 105, 1395-1404

**174.** Lambert CC, and Goode CA (1992) Glycolipid linkage of a polyspermy blocking glycosidase to the ascidian egg surface. *Dev. Biol.* 154, 95-100

175. Lambert H (1984) Role of sperm-surface glycoproteins in gamete recognition in two mouse species. *J. Reprod. Fertil.* 70, 281-284
176. Lambert H, Overstreet JW, Morales P, Hanson FW, and Yanagimachi R (1985) Sperm capacitation in the female reproductive tract. *Fertil. Steril.* 43, 325-327
177. Lambert H, and Van Le A (1984) Possible involvement of a sialyated component of the sperm plasma membrane in sperm-zona interaction in the mouse. *Gamete Res.* 10, 153-163
178. Langlais J, Kan FWK, Granger L, Raymond L, Bleau G, and Roberts KD (1988) Identification of sterol acceptors that stimulate cholesterol efflux from human spermatozoa during in vitro capacitation. *Gamete Res.* 20, 185-201
179. Langlais J, and Roberts KD (1985) A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete Res.* 12, 183-224
180. Leaback DH, and Walker PG (1961) Studies on Glucosaminidase. 4 The fluorometric assay of N-Acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase. *Biochem. J.* 78, 151-156
181. Ledbetter JA, June CH, Grossmaire LS, and Rabinovitch PS (1987) Crosslinking of a surface antigens causes mobilization of intracellular ionized calcium in T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 1384-1388
182. Lee MA, Check JH, and Kopf GS (1992) A guanine nucleotide-binding regulatory protein in human sperm mediates acrosomal exocytosis induced by the human zona pellucida. *Mol. Reprod. Dev.* 31, 78-86

- 183.** Lenz RW, Ax RL, Grimek HJ, and First NL (1982) Proteoglycan from bovine follicular fluid enhances the acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 104, 1092-1098
- 184.** Levine E, Werner R, and Dahl G (1991) Cell-cell channel formation and lectins. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 261, C1025-C1032
- 185.** Leyton L, LeGuen P, Bunch D, and Saling PM (1992) Regulation of mouse gamete interaction by a sperm tyrosine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 11692-11695
- 186.** Leyton L, and Saling PM (1989) 95 kD sperm proteins bind ZP3 and serve as tyrosine kinase substrates in response to zona binding. *Cell* 57, 123
- 187.** Leyton L, and Saling PM (1989) Evidence that aggregation of sperm receptors by ZP3 triggers the acrosome reaction. *J. Cell Biol.* 108, 2163-2168
- 188.** Litscher E, and Honegger TG (1991) Glycoprotein constituents of the vitelline coat of *Phallusia mammillata* (Ascidacea) with fertilization inhibiting activity. *Dev. Biol.* 148, 536-551
- 189.** Liu HW, Wang JJ, Chao CF, and Muller C (1991) Identification of two maturation-related, wheat-germ-lectin-binding proteins on the surface of mouse sperm. *Acta Anat. (Basel)* 142, 165-170
- 190.** Logothetis DE, Kurachi Y, Galper J, Neer EJ, and Clapham DE (1987) The  $\beta$  subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K<sup>+</sup> channel in heart. *Nature* 325, 321-326
- 191.** Lopez LC, Bayna EM, Litoff D, Shaper NL, Shaper JH, and Shur BD (1985) Receptor function of mouse sperm surface galactosyltransferase during fertilization. *J. Cell Biol.* 101, 1501-1510

**192.** Lopez LC, Youakim A, Evans SC, and Shur BD (1991) Evidence for a molecular distinction between Golgi and cell surface forms of  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase. *J. Biol. Chem.* 266, 15984-15991

**193.** Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, and Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 267-275

**194.** Macek MB, Lopez LC, and Shur BD (1991) Aggregation of  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase on mouse sperm induces the acrosome reaction. *Dev. Biol.* 147, 440-444

**195.** Macek MB, and Shur BD (1988) Protein-Carbohydrate complementarity in mammalian gamete recognition. *Gamete Res.* 20, 93-109

**196.** Mack S, Bhattacharyya AK, Joyce C, Van Der Ven H, and Zaneveld LJD (1983) Acrosomal enzymes of human spermatozoa before and after in vitro capacitation. *Biol. Reprod.* 28, 1032-1042

**197.** Magargee SF, Kunze E, and Hammerstedt RH (1988) Changes in lectin-binding features of ram sperm surfaces associated with epididymal maturation and ejaculation. *Biol. Reprod.* 38, 667-687

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

**199.** Mahony MC, Oehninger S, Clark GF, Acosta AA, and Hodgen GD (1991) Fucoidin inhibits the zona pellucida-induced acrosome reaction in human spermatozoa. *Contraception* 44, 657-665

**200.** Marchand L, Frenette G, and Tremblay RR (1990) Fate of  $\alpha$ -1,4-glucosidases and cathepsin D in the rat epididymis after vasectomy. *Enzyme* 43, 192-196

**201.** Mattera R, Graziano MP, Yatani A, Zhou Z, Graf R, Codina J, Birnbaumer L, Gilman AG, and Brown AK (1989) Splice variants of the alpha-subunit of the G-protein Gs activate both adenylate cyclase and calcium channels. *Science* 243, 804

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

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

**204.** Meizel S, and Turner KO (1983) Stimulation of an exocytotic event, the hamster sperm acrosome reaction by cis-unsaturated fatty acids. *FEBS Lett.* 161, 315

**205.** Meizel S, and Turner KO (1983) Serotonin or its agonist 5-methoxytryptamine can stimulate hamster sperm acrosome reactions in a more direct manner than catecholamines. *J. Exp. Zool.* 226, 171

**206.** Meizel S, and Turner KO (1984) The effects of products and inhibitors of arachidonic acid metabolism on the hamster sperm acrosome reaction. *J. Exp. Zool.* 231, 283-288

**207.** Miller DJ, and Ax RL (1990) Carbohydrates and fertilization in animals. *Mol. Reprod. Dev.* 26, 184-198

**208.** Miller DJ, Cross NL, Vazquez-Levin M, and Shur BD (1991) The role of sperm galactosyltransferase in fertilization: presence and possible function in humans and other mammals. In: Comparative spermatology 20 years after (Baccetti B, ed) pp. 569-574, Serono Symposia Publications - Raven Press, New York

**209.** Miller DJ, Macek MB, and Shur BD (1992) Complementarity between sperm surface  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase and egg-coat ZP3 mediates sperm-egg binding. *Nature* 357, 589-593

**210.** Miranda PV, Brandelli A, and Tezon JG (1993)  $\beta$ -N-Acetylglucosaminidase: A Possible Marker for Sperm Maturation in Humans. In: Current Topics in Andrology (Oshima H and Burger HG, eds) pp. 98-103, Japan Society of Andrology, Tokyo

**211.** 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

**212.** Monsigny M, Roche AC, and Midoux P (1984) Uptake of Neoglycoproteins via membrane lectin(s) of L1210 cells evidenced by quantitative flow cytometry and drug targeting. *Biol. Cell.* 51, 187-196

**213.** Moore HDM (1980) Localization of specific glycoproteins secreted by the rabbit and hamster epididymis. *Biol. Reprod.* 22, 705-718

**214.** Moore HDM, and Bedford JM (1983) The interaction of mammalian gametes in the female. In: Mechanisms and control of animal fertilization (Hartmann JF, ed) pp. 453-497, Academic Press, New York

**215.** Morales P, Cross NL, Overstreet JW, and Hanson FW (1989) Acrosome-intact and acrosome-reacted human sperm can initiate binding to the zona pellucida. *Dev. Biol.* 133, 385

- 216.** Mori K, Daitoh T, Irahara M, Kamada M, and Aono T (1989) Significance of D-mannose as a sperm receptor site on the zona pellucida in human fertilization. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 161, 207-211
- 217.** Morton B, and Albagli L (1973) Modification of hamster sperm adenyl cyclase by capacitation in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 50, 695-703
- 218.** Multamaki S, and Suominen J (1976) Distribution and Removal of the Acrosin of Bull Spermatozoa. *Int. J. Fertil.* 21, 69-81
- 219.** Myles DG, 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
- 220.** Nagae T, Yanagimachi R, Srivastava PN, and Yanagimachi H (1986) Acrosome reaction in human spermatozoa. *Fertil. Steril.* 45, 701-707
- 221.** Niggli V, and Burger MM (1987) Interaction of the cytoskeleton with the plasma membrane. *J. Membrane Biol.* 100, 97-121
- 222.** Nikolajczyk BS, and O'Rand MG (1992) Characterization of rabbit testis  $\beta$ -galactosidase and arylsulfatase A: Purification and localization in spermatozoa during the acrosome reaction. *Biol. Reprod.* 46, 366-378
- 223.** Nikolopoulou M, Soucek DA, and Vary JC (1985) Changes in the lipid content of boar sperm plasma membranes during epididymal maturation. *Biochim. Biophys. Acta* 815, 486-498

**224.** O'Brien RM, Soos MA, and Siddle K (1987) Monoclonal antibodies to the insulin receptor stimulate the intrinsic tyrosine kinase activity by cross-linking receptor molecules. *EMBO J.* 6, 4003-4010

**225.** O'Rand MG, and Fisher SJ (1987) Localization of zona pellucida binding sites on rabbit spermatozoa and induction of the acrosome reaction by solubilized zonae. *Dev. Biol.* 119, 551

**226.** O'Rand MG, Matthews JE, Welch JE, and Fisher SJ (1985) Identification of zona binding proteins of pig, rabbit, human and mouse spermatozoa on nitrocellulose blots. *J. Exp. Zool.* 235, 423-428

**227.** Oehninger S, Clark GF, Acosta AA, and Hodgen GD (1991) Nature of the inhibitory effect of complex saccharide moieties on the tight binding of human spermatozoa to the human zona pellucida. *Fertil. Steril.* 55, 165-169

**228.** Oehninger S, Clark GF, Fulgham D, Blackmore PF, Mahony MC, Acosta AA, and Hodgen GD (1992) Effect of fucoidin on human sperm-zona pellucida interactions. *J. Androl.* 13, 519-525

**229.** Okamura N, Fukuda A, Tanba M, Sugita Y, and Nagai T (1992) Changes in the nature of calcium transport systems on the porcine sperm plasma membrane during epididymal maturation. *Biochim. Biophys. Acta* 1108, 110-114

**230.** Okamura N, Tajima Y, Soejima A, Masuda H, and Sugita Y (1985) Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 260, 9699-9705

- 231.** Okamura N, Tajima Y, and Sugita Y (1988) Decrease in bicarbonate transport activities during epididymal maturation of porcine sperm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157, 1280-1287
- 232.** Okamura N, Tanba M, Fukuda A, Sugita Y, and Nagai T (1993) Forskolin stimulates porcine sperm capacitation by increasing calcium uptake. *FEBS Lett.* 316, 283-286
- 233.** Olden K, Parent JB, and White SL (1982) Carbohydrate moieties of glycoproteins. A re-evaluation of their function. *Biochim Biophys Acta* 650, 209-232
- 234.** Oliphant G, Reynolds AB, and Thomas TS (1985) Sperm surface components involved in the control of the acrosome reaction. *Am. J. Anat.* 174, 269-283
- 235.** Oura C (1971) The ultrastructure and development of the neck region of the golden hamster spermatozoa. *Monitore Zool. Ital.* 5, 253-264
- 236.** Oura C, and Toshimori K (1990) Ultrastructural studies on the fertilization of mammalian gametes. *Int. Rev. Cytol.* 122, 105-152
- 237.** Overstreet JW, and Cooper GW (1979) The time and location of the acrosome during sperm transport in the female rabbit. *J. Exp. Zool.* 209, 97
- 238.** Pampiglione JS, Tan SL, and Campbell S (1993) Acrosome reactivity in spermatozoa of different morphology in response to stimulation with follicular fluid. *Hum. Reprod.* 8, 412-415
- 239.** Parks JE, and Hammerstedt RH (1991) Developmental changes occurring in the lipid of ram epididymal sperm plasma membranes. *Biol. Reprod.* 32, 653-668

- 240.** Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA, and First NL (1988) Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.* 38, 1171-1180
- 241.** Peterson RN, Hunt WP, and Henry LH (1986) Interaction of boar spermatozoa with porcine oocytes: Increase in proteins with high affinity for the zona pellucida during epididymal transit. *Gamete Res.* 14, 57-64
- 242.** Peterson RN, Russell L, Bundman D, and Freund M (1979) Sperm-egg interaction: evidence for boar sperm plasma membrane receptors for porcine zona pellucida. *Science* 207, 73-74
- 243.** Pfaffinger PJ, Martin JM, Hunter DD, Nathanson NM, and Hille B (1985) GTP-binding proteins couple cardiac muscarinic receptors to a K<sup>+</sup> channel. *Nature* 317, 536-538
- 244.** Phillips DM (1975) Mammalian sperm structure. In: *American Handbook of Physiology* (Hamilton DW and Greep RO, eds) pp. 405-419, American Physiological Society, Washington
- 245.** Piko L (1967) Immunological phenomena in the reproductive process. *Int. J. Fertil.* 12, 377-383
- 246.** Quasba PK, Hewlett IK, and Byers S (1983) The presence of the milk protein,  $\alpha$ -lactoalbumin and its mRNA in the rat epididymis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 117, 306-312
- 247.** Quinn PJ, and White IG (1967) Active cation transport in dog spermatozoa. *Biochem. J.* 104, 328-340
- 248.** Quijcho FA (1986) Carbohydrate-binding proteins: tertiary structures and protein-sugar interactions. *Ann. Rev. Biochem.* 55, 287-315

- 249.** Rademacher TW, Parekh RB, and Dwek RA (1988) Glycobiology. *Annu. Rev. Biochem.* 57, 785-838
- 250.** Rahi H, and Srivastava PN (1983) Hormonal regulation of lysosomal hydrolases in the reproductive tract of the rabbit. *J. Reprod. Fertil.* 67, 447-455
- 251.** Rahi H, and Srivastava PN (1984) Lysosomal hydrolases in reproductive organs during estrous cycle of the hamster. *Gamete Res.* 10, 57-66
- 252.** Rapraeger A, Jalkanen M, and Bernfield M (1986) Cell Surface Proteoglycan Associates with the Cytoskeleton at the Basolateral Cell Surface of Mouse Mammary Epithelial Cells. *J. Cell Biol.* 103, 2683-2696
- 253.** Ravnik SE, Zarutskie PW, and Muller CH (1990) Lipid transfer activity in human follicular fluid: Relation to human sperm capacitation. *J. Androl.* 11, 216-226
- 254.** Robinson D, and Stirling JL (1968) N-Acetyl-B-Glucosaminidases in Human Spleen. *Biochem. J.* 107, 321-327
- 255.** Romrell LJ, O'Rand MG, Sandow PS, and Porter JP (1982) Identification of surface autoantigens which appear during spermatogenesis. *Gamete Res.* 5, 35-48
- 256.** Rosiere TK, and Wassarman PM (1992) Identification of a region of mouse zona pellucida glycoprotein mZP3 that possesses sperm receptor activity. *Dev. Biol.* 154, 309-317
- 257.** Roux E, and Kan FWK (1991) Changes of glycoconjugate contents of the zona pellucida during oocyte growth and development in the golden hamster: A quantitative cytochemical study. *Anatomical Record* 230, 347-360

- 258.** Rudy B (1988) Diversity and ubiquity of K<sup>+</sup> channels. *Neuroscience* 25, 729-749
- 259.** Rufas O, Fisch B, Seligman J, Tadir Y, Ovadia J, and Shalgi R (1991) Thiol status in human sperm. *Mol. Reprod. Dev.* 29, 282-288
- 260.** Ruknudin A, and Silver IA (1990) Ca<sup>2+</sup> uptake during capacitation of mouse spermatozoa and the effect of an anion transport inhibitor on Ca<sup>2+</sup> uptake. *Mol. Reprod. Dev.* 26, 63-68
- 261.** Russell LD, Peterson NR, Hunt W, and Strack LE(1984) Posttesticular surface modifications and contributions of reproductive fluids to the surface polypeptide composition of boar spermatozoa. *Biol. Reprod.* 30, 959-978
- 262.** Saling PM (1981) Involvement of trypsin-like activity in binding of mouse spermatozoa to zona pellucida. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 6231-6235
- 263.** Saling PM (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
- 264.** Saling PM, and Bedford JM (1981) Absence of species-specificity for mammalian sperm capacitation in vivo. *J. Reprod. Fertil.* 63, 119-123
- 265.** Saling PM, Sowinski J, and Storey BT (1979) An ultrastructural study of epididymal mouse spermatozoa binding to zonae pellucidae in vitro: sequential relationship to the acrosome reaction. *J. Exp. Zool.* 209, 229

- 266.** Saling PM, and Storey BT (1979) Mouse gamete interactions during fertilization in vitro: chlortetracycline as fluorescent probe for the mouse sperm acrosome reaction. *J. Cell Biol.* 83, 544
- 267.** Salzmann GS, Greve JM, Roller RJ, and Wassarman PM (1983) Biosynthesis of the sperm receptor during oogenesis in the mouse. *EMBO J.* 2, 1451-1456
- 268.** Saragueta P, Tezon JG, and Baranao JL (1989) Isolation of a protein from human follicular fluid that induces the acrosomal reaction in human sperm. In: *Gamete Interaction. Prospects for Immunocontraception* (Alexander NJ, Griffin D, Spieler JM, and Waites GMH, eds) pp. 628, Wiley-Liss, New York
- 269.** Schackmann RW, Christen R, and Shapiro BM (1981) Membrane potential depolarization and increased intracellular pH accompany the acrosome reaction of sea urchin sperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 6066-6070
- 270.** Schlegel RA, Hammerstedt R, Cofer GP, and Kozarsky K (1986) Changes in the organization of the lipid bilayer of the plasma membrane during spermatogenesis and epididymal maturation. *Biol. Reprod.* 34, 379-391
- 271.** Shalgi R, and Phillips DM (1980) Mechanism of in vitro fertilization in the hamster. *Biol. Reprod.* 23, 433-444
- 272.** Shapiro BM, Schackmann RW, and Gabel CA (1981) Molecular approaches to the study of fertilization. *Ann. Rev. Biochem.* 50, 815-843
- 273.** Sharon N, and Lis H (1989) Lectins as cell recognition molecules. *Science* 246, 227-234
- 274.** Sharon N, and Lis H (1993) Carbohydrates in cell recognition. *Sci. Am.* 268, 82-89

**275.** Shimomura H, Dangott LJ, and Garbers DL (1986) Covalent coupling of a resact analogue to guanylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 261, 15778

**276.** Shinohara H, Yanagimachi R, and Srivastava PN (1985) Enhancement of the acrosome reaction of hamster spermatozoa by proteolytic enzymes, kallikrein, trypsin and chymotrypsin. *Gamete Res.* 11, 19-28

**277.** Shivaji S, and Jagannadham MV (1992) Steroid-induced perturbations of membranes and its relevance to sperm acrosome reaction. *Biochim. Biophys. Acta* 1108, 99-109

**278.** Shur BD, and Hall NG (1982) A role for mouse sperm surface galactosyl transferase in sperm binding to the egg zona pellucida. *J. Cell Biol.* 95, 574-579

**279.** Shur BD, and Neely CA (1988) Plasma membrane association, purification, and partial characterization of mouse sperm  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase. *J. Biol. Chem.* 263, 17706-17715

**279 (b).** Siegel S, and Castelan NJ Jr (1988) The case of k related samples. In: *Nonparametric statistics for the behavioral sciences.* (Anker JD, ed) McGraw-Hill Book Company, Singapore, 1988, pp.168.

**280.** Siiteri JE, Gottlieb W, and Meizel S (1988) Partial characterization of a fraction from human follicular fluid that initiates the human sperm acrosome reaction in vitro. *Gamete Res.* 20, 25-43

**281.** Singer SJ, and Nicolson GL (1972) The fluid mosaic model of the structure of the cell membrane. *Science* 175, 720-731

**282.** Skudlarek MD, and Orgebin-Crist, MC (1986) Glycosidases in cultured rat epididymal cells: enzyme activity, synthesis and secretion. *Biol. Reprod.* 35, 167-178

- 283.** Sorkin BC, Hemperly JJ, Edelman GM, and Cunningham BA (1988) Phosphomannosyl receptors may participate in the adhesion interaction between lymphocytes and high endothelial venules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 7617-7621
- 284.** Spedding M and Paoletti R (1992) Classification of Calcium Channels and the Sites of Action of Drugs Modifying Channel Function. *Pharmacol. Rev.* 44, 363-376
- 285.** Srivastava PN, Akruk SR, and Williams WL (1979) Disolution of rabbit zona by sperm acrosome extract. Effect of calcium. *J. Exp. Zool.* 207, 521-529
- 286.** Srivastava PN, Farooqui AA, and Gould KG (1981) Studies on hydrolytic enzymes of chimpanzee semen. *Biol. Reprod.* 25, 363-369
- 287.** Srivastava SK, Awasthi YC, Yoshida A, and Beutler E (1974) Studies on Human  $\beta$ -D-N-Acetylhexosaminidases. I. Purification and proprieties. *J. Biol. Chem.* 249, 2043-2048
- 288.** Stengel D, and Hanoune J (1984) The sperm adenylate cyclase. *Ann. NY Acad. Sci.* 438, 18-28
- 289.** Storey BT, Lee MA, Muller C, Ward CR, and Wirtshafter DG (1984) Binding of mouse spermatozoa to the zona pellucidae of mouse eggs in cumulus: evidence that the acrosomes remain substantially intact. *Biol. Reprod.* 31, 119
- 290.** Suarez SS, Katz DF, and Overstreet JW (1983) Movement characteristics and acrosomal status of rabbit spermatozoa recovered at the site and time of fertilization. *Biol. Reprod.* 29, 1277
- 291.** Sullivan R, and Bleau G (1985) Interaction of isolated componets from mammalian sperm and egg. *Gamete Res.* 12, 101-116

**292.** Sullivan R, St-Jacques S, Chapdelaine A, Roberts KD, and Bleau G (1983) Detection of a sperm membrane protein with an affinity for the zona pellucida. *Biol. Reprod.* 28 suppl.1, n 13

**293.** Talbot P (1985) Sperm penetration through oocyte investments in mammals. *Am. J. Anat.* 174, 331

**294.** Talbot P, and Chacon RS (1980) A new procedure for rapidly scoring acrosome reaction of human sperm. *Gamete Res.* 3, 211

**295.** Talbot P, and Chacon RS (1981) A triple stain technique for scoring acrosome reaction of human sperm. *J. Exp. Zool.* 215, 201

**296.** Talbot P, and Franklin LE (1978) Surface modification of guinea-pig sperm during in vitro capacitation: an assessment using lectin-induced agglutination of living sperm. *J. Exp. Zool.* 203, 1-14

**297.** Tash JS, and Means AR (1983) Cyclic Adenosine 3',5',monophosphate,calcium and protein phosphorylation in flagellar motility. *Biol. Reprod.* 28, 75-104

**298.** Taylor ME, and Drickamer K (1993) Structural requirements for high affinity binding of complex ligands by the macrophage mannose receptor. *J. Biol. Chem.* 268, 399-404

**299.** Tesarik J (1985) Comparison of acrosome reaction-inducing activities of human cumulus oophorus, follicular fluid and ionophore A23187 on human sperm populations of proven fertilizing ability in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 74, 383

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

- 294.** Talbot P, and Chacon RS (1980) A new procedure for rapidly scoring acrosome reaction of human sperm. *Gamete Res.* 3, 211
- 295.** Talbot P, and Chacon RS (1981) A triple stain technique for scoring acrosome reaction of human sperm. *J. Exp. Zool.* 215, 201
- 296.** Talbot P, and Franklin LE (1978) Surface modification of guinea-pig sperm during in vitro capacitation: an assessment using lectin-induced agglutination of living sperm. *J. Exp. Zool.* 203, 1-14
- 297.** Tash JS, and Means AR (1983) Cyclic Adenosine 3',5',monophosphate,calcium and protein phosphorylation in flagellar motility. *Biol. Reprod.* 28, 75-104
- 298.** Taylor ME, and Drickamer K (1993) Structural requirements for high affinity binding of complex ligands by the macrophage mannose receptor. *J. Biol. Chem.* 268, 399-404
- 299.** Tesarik J (1985) Comparison of acrosome reaction-inducing activities of human cumulus oophorus, follicular fluid and ionophore A23187 on human sperm populations of proven fertilizing ability in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 74, 383
- 300.** Tesarik J, Carreras A, and Mendoza C (1993) Differential sensitivity of progesterone- and zona pellucida-induced acrosome reactions to pertussis toxin. *Mol. Reprod. Dev.* 34, 183-189
- 301.** Tesarik J, Mendoza C, and Carreras A (1991) Expression of D-mannose binding sites on human spermatozoa: Comparison of fertile donors and infertile patients. *Fertil. Steril.* 56, 113-118
- 302.** Tezon JG, Vazquez MH, Pineiro L, de Larminat MA, and Blaquier JA (1985) Identification of androgen induced proteins in human epididymis. *Biol. Reprod.* 32, 584-590

**309.** Toyoda Y, and Chang MC (1974) Capacitation of epididymal spermatozoa in a medium with high K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> ratio and cAMP for the fertilization of rat eggs in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 36, 125-134

**310.** Töpfer-Petersen E, Steinberger M, Von Eschenbach CE and Zucker A (1990) Zona pellucida-binding of boar sperm acrosin is associated with the N-terminal peptide of the acrosin B-chain (heavy chain). *FEBS Lett.* 265, 51-54

**311.** Triana LR, Babcock DF, Lorton SP, First NL, and Lardy HA (1980) Release of 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

**312.** Tulsiani DRP, Coleman VD, and Touster O (1988) Rat epididymal  $\alpha$ -D-mannosidase: purification, carbohydrate composition, substrate specificity, and antibody production. *Arch. Biochem. Biophys.* 267, 60-95

**313.** Tulsiani DRP, Nagdas SK, Cornwall GA, and Orgebin-Crist MC (1992) Evidence for the presence of high-mannose/hybrid oligosaccharide chain(s) on the mouse ZP2 and ZP3. *Biol. Reprod.* 46, 93-100

**314.** Tulsiani DRP, Skudlarek MD, Holland MK, and Orgebin-Crist MC (1993) Glycosylation of rat sperm plasma membrane during epididymal maturation. *Biol. Reprod.* 48, 417-428

**315.** Tulsiani DRP, Skudlarek MD, Nagdas SK, and Orgebin-Crist MC (1993) Purification and characterization of rat epididymal-fluid  $\alpha$ -D-mannosidase: Similarities to sperm plasma-membrane  $\alpha$ -D-mannosidase. *Biochem. J.* 290, 427-436

**316.** Tulsiani DRP, Skudlarek MD, and Orgebin-Crist MC (1989) Novel  $\alpha$ -D-mannosidase of rat sperm plasma membranes: Characterization and potential role in sperm-egg interactions. *J. Cell Biol.* 109, 1257-1267

**317.** Tulsiani DRP, Skudlarek MD, and Orgebin-Crist MC (1990) Human sperm plasma membranes possess  $\alpha$ -D-mannosidase activity but no galactosyltransferase activity. *Biol. Reprod.* 42, 843-858

**318.** Uesugi S, and Yamazoe S (1966) Presence of sodium-potassium-stimulated ATPase in boar epididymal spermatozoa. *Nature* 209, 403-404

**319.** Vernon RB, Muller CH, Herr JC, Feuchter FA, and Eddy EM (1982) Epididymal secretion of a mouse sperm surface component recognized by a monoclonal antibody. *Biol. Reprod.* 26, 523-535

**320.** Visconti PE, Muschietti JP, Flawia MM, and Tezon JG (1990) Bicarbonate dependence of cAMP accumulation induced by phorbol esters in hamster spermatozoa. *Biochim. Biophys. Acta* 1054, 231-236

**321.** Volgmayr JK, and Sawyer FR (1986) Surface transformation of ram spermatozoa in uterus, oviduct and cauda epididymal fluids in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 78, 315-325

**322.** Ward CR, Storey BT, and Kopf GS (1992) Activation of a Gi protein in mouse sperm membranes by solubilized proteins of the zona pellucida, the egg's extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* 267, 14061-14067

**323.** Wassarman PM (1989) Zona pellucida glycoproteins. *Ann. Rev. Biochem.* 57, 415-443

**324.** Wassarman PM, Bleil JD, Florman HM, Greve JM, and Roller RJ (1986) Gametogenesis and the early embryo. «MDUL» (Gall J, ed) pp. 371-388, Liss, New York

**325.** Wassarman PM, Florman HM, and Greve JM (1985) Receptor-mediated sperm-egg interaction in mammals. In: Fertilization, Vol.2 (Metz CB and Monroy A, eds) pp. 341-360, Academic press, New York

**326.** Watson PF, and Plummer JM (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

**327.** Weinman DE, and Williams WL (1964) Mechanism of capacitation of rabbit spermatozoa. Nature 203, 423-424

**328.** Weston SA, and Parish CR (1992) Evidence that mannose recognition by splenic sinusoidal cells plays a role in the splenic entry of lymphocytes. Eur. J. Immunol. 22, 1975-1981

**329.** Wilde MW, Ward CR, and Kopf GS (1992) Activation of a G protein in mouse sperm by the zona pellucida, an egg-associated extracellular matrix. Mol. Reprod. Dev. 31, 297-306

**330.** Wilson JR, and Weiser MM (1992) Colonic cancer cell (HT29) adhesion to laminin is altered by differentiation: Adhesion may involve galactosyltransferase. Exp. Cell Res. 201, 330-334

**331.** Wilson WL, and Oliphant G (1987) Isolation and biochemical characterization of the subunits of the rabbit sperm acrosome stabilizing factor. Biol. Reprod. 37, 159-169

- 332.** Wolf DE, Hagopian SS, and Ishijima S (1986) Changes in sperm plasma membrane lipid diffusibility after hyperaction during in vitro capacitation in the mouse. *J. Cell Biol.* 102, 1372
- 333.** Wolf DP, Boldt J, Byrd W, and Bechtol KB (1985) Acrosomal status evaluation in human ejaculated sperm with monoclonal antibodies. *Biol. Reprod.* 32, 1157
- 334.** World Health Organization (1987) WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. Cambridge University Press, Cambridge
- 335.** Yanagimachi R (1980) In vitro sperm capacitation and fertilization of golden hamster eggs in a chemical defined medium. *Arch. Androl.* 5, 62-63
- 336.** Yanagimachi R (1981) Mechanism of Fertilization in Mammals. In: *Fertilization and Embryonic Development In Vitro* (Mastroianni L Jr and Biggers JD, eds) pp. 82-182, Plenum Press, New York
- 337.** Yanagimachi R (1987) The acrosome reaction: Analysis of its mechanism using guinea pig spermatozoa. In: *New Horizons in Sperm Cell Research* (Mohri H, ed) pp. 19-29, Japan Sci. Soc. Press/Gordon and Breach Sci. Publ., Tokio/New York
- 338.** Yanagimachi R (1988) Mammalian fertilization. In: *Physiology of Reproduction* (Knobil E and Neill J, eds) pp. 135-185, Raven Press, New York
- 339.** Yanagimachi R, and Chang MC (1963) Fertilization of hamster eggs in vitro. *Nature* 200, 281-282
- 340.** Yanagimachi R, and Cummins JM (1985) Optical changes in the acrosomal caps of golden hamster spermatozoa prior to the acrosome reaction. *Proc. Annu. Conf. Soc. Study Reprod.* (Aberdeen) abstract 20, (Abstract)

**341.** Yanagimachi R, and Phillips DM (1984) The status of acrosomal caps of hamster spermatozoa immediately before fertilization in vivo. *Gamete Res.* 9, 1-9

**342.** Yanagimachi R, and Usui N (1974) Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. *Exp. Cell Res.* 89, 161-174

**343.** Young GP, Koide SS, Goldstein M, and Young JD (1988) Isolation and partial characterization of an ion channel protein from human sperm membranes. *Arch. Biochem. Biophys.* 262, 491-500

**344.** Young LG, Gould KG, and Hinton BT (1986) Lectin Binding Sites on the plasma membrane of epididymal and ejaculated chimpanzee sperm. *Gamete Res.* 14, 75-87

**345.** Young LG, Hinton BT, and Gould KG (1985) Surface changes in chimpanzee sperm during epididymal transit. *Biol. Reprod.* 32, 399-412

**346.** Yurewicz EC, Pack BA, and Sacco AG (1992) Porcine oocyte zona pellucida Mr 55,000 glycoproteins: Identification of O-glycosylated domains. *Mol. Reprod. Dev.* 33, 182-188

**347.** Zamboni L (1992) Sperm structure and its relevance to infertility: An electron microscopic study. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 116, 325-344

**348.** Zamboni L, and Stefanini M (1971) The fine structure of the neck of mammalian spermatozoa. *Anatomical Record* 169, 155-172

**349.** Zanetta JP, Kuchler S, Lehmann S, Badache A, Maschke S, Thomas D, Dufourcq P, and Vincendon G (1992) Glycoproteins and lectins in cell adhesion and cell recognition processes. *Histochem. J.* 24, 791-804