

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**EFFECTO DEL ÁCIDO GAMA-AMINOBUTÍRICO (GABA) EN LA  
CAPACITACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE CARNERO**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos  
Aires en el área de Ciencias Biológicas

Autor: ALBERTO VALCARCEL

Director: Dr. MARCELO A. DE LAS HERAS

Consejero de estudios: DRA. MARIA CRISTINA MAGGESE

CENTRO DE INVESTIGACIONES REPRODUCTIVAS  
PEREZ COMPANC

Buenos Aires, 2007

**EFFECTO DEL ÁCIDO GAMA-AMINO BUTÍRICO (GABA) EN LA  
CAPACITACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE CARNERO**

**Jurado:** \_\_\_\_\_

**Firma:** \_\_\_\_\_

**Calificación:** \_\_\_\_\_

**Jurado:** \_\_\_\_\_

**Firma:** \_\_\_\_\_

**Calificación:** \_\_\_\_\_

**Jurado:** \_\_\_\_\_

**Firma:** \_\_\_\_\_

**Calificación:** \_\_\_\_\_

## **EFFECTO DEL ÁCIDO GAMA-AMINOBUTÍRICO (GABA) EN LA CAPACITACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE CARNERO**

Los espermatozoides de Mamíferos deben sufrir un proceso llamado capacitación antes de poder llevar a cabo el proceso de fecundación. La capacitación consiste en una serie de modificaciones funcionales tanto bioquímicas como biofísicas que permiten al espermatozoide adquirir la competencia para fecundar al oocito. Estos procesos pueden llevarse a cabo en condiciones *in vitro*, sin embargo, el papel de varios componentes del medio de cultivo recién ahora está siendo identificado a nivel celular y molecular.

El ácido gama-aminobutírico (GABA) es el neurotransmisor inhibitor más importante en el Sistema Nervioso Central (SNC) de los Vertebrados. La existencia de receptores gabaérgicos en el sistema reproductivo (fuera del SNC) fue previamente establecida y se ha sugerido que los receptores gabaérgicos participarían en la modulación de la función reproductiva.

Por otra parte, otro de los eventos intracelulares principales conocido durante la capacitación espermática es la fosforilación de proteínas en residuos tirosina.

Teniendo en cuenta todo esto, los objetivos de la presente tesis fueron estudiar: 1) los posibles sitios de unión específica del GABA en el espermatozoide de carnero, 2) el efecto del GABA sobre la capacitación *in vitro* del espermatozoide de carnero, 3) la fosforilación de proteínas en residuos tirosina como consecuencia de la capacitación por el uso de GABA.

Nuestros resultados mostraron que el GABA presente en condiciones fisiológicas en el oviducto de oveja posee una acción sobre la capacitación de los espermatozoides, en un mecanismo mediado por un receptor de GABA tipo A, y que la fosforilación en residuos tirosina podría mediar este mecanismo. Estos resultados pueden contribuir al desarrollo de medios de capacitación y fecundación químicamente definidos, evitando la incertidumbre que resulta del uso de componentes de origen biológico.

**Palabras clave:** Clortetraciclina, fertilidad, *in vitro*, lectina, neurotransmisor, ovino, receptor, reproducción, semen

## **EFFECT OF GAMMA-AMINOBUTIRIC ACID (GABA) ON THE CAPACITATION OF RAM SPERMATOZOA**

Mamalian sperm are required to undergo a process known as capacitation before they effect the fertilization process. Capacitation consists of a series of functional biochemical and biophysical modifications that render the ejaculated spermatozoa competent for fertilization of the oocyte. These processes can also be supported *in vitro*, however, the role of various components of the culture medium is only now being better identified at the cellular and molecular level.

Gamma-aminobutyric acid (GABA) is the most important inhibitory neurotransmitter in the vertebrate Central Nervous System (CNS). GABAergic receptors were previously reported to be distributed in reproductive systems beside CNS and predicted to participate in the modulation of reproductive function.

On the other hand, one of the key intracellular events during capacitation is protein tyrosine phosphorylation.

Taking this into account, the objectives of this thesis were to study: 1) the possible GABA specific binding sites in ram spermatozoa, 2) the GABA effect on the *in vitro* ram sperm capacitation, 3) the protein tyrosine phosphorylation of ram sperm as a consequence of capacitation by the use of GABA.

Our results showed that GABA present in physiological conditions in sheep oviduct exerts an action on sperm capacitation, through a type-A GABA receptor-mediated mechanism, and that phosphorylation in tyrosine residues could mediate this mechanism. These results may contribute to the development of chemically defined capacitation and fertilization media, thus avoiding the uncertainty derived from the use of components of biological origin.

**Key words:** Chlortetracycline, fertility, *in vitro*, lectin, neurotransmitter, ovine, receptor, reproduction, semen

A **Graciela**, mi esposa, por estar siempre y alentar mi trabajo como biólogo.

**A Guadalupe, Florencia y Lucía,**  
nuestras hijas, por haber llenado de  
felicidad nuestras vidas, y por haber hecho  
de “la interacción espermatozoide-ooocito”  
una expresión con mucho más que un  
significado biológico.

A **Manuela** y **Manuel** (mis padres), a **Graciela** (mi suegra), a **Oscar** y **Jorge** (mis hermanos), a **Claudia, Mara, Marcelo, Martín** y **Andrés** (mis cuñados) y a **Guillermina** y **Mariana** (mis conuñadas), quienes sin entender claramente lo que hacía, me apoyaron permanentemente.

## **AGRADECIMIENTOS**

Deseo agradecer:

-A mi Director de Tesis, el Dr. Marcelo de las Heras, por la confianza en mi trabajo y por haberme guiado en esta tarea.

-A mi Consejera de Tesis, la Dra. María Cristina Magesse, por iniciarme en la investigación y ser su becario durante años.

-A la Dra. Graciela Guerrero y el Dr. Victor Cussac, por transmitirme su fervor para el trabajo en investigación.

-A mis compañeros de inicio en la investigación, Dr. Pablo Schwarzbaum, Dra. Sonia Titina Zapata, Dr. Mario Matkovic y Dr. Mario Ravaglia, por tantas horas e ilusiones compartidas.

-Al Dr. Daniel Moses y al Lic. Leandro Pérez, con quienes desarrollé el trabajo experimental que constituye esta Tesis, por su empuje y sincera alegría para compartir todo el trabajo cotidiano.

-Al Lic. Gustavo Martinez, por ser un gran amigo además de un compañero de trabajo durante más de quince años.

-Al Dr. Dante Paz, Dra. Fabiana Lo Nostro y Dra. Paula Vissio, por su generosa ayuda desde el Laboratorio de Embriología Animal de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

-A la Dra. Claudia Tomes, por su generosa predisposición en las consultas realizadas.

-A la Sra. Ana Andrea Bondia, por su infinita paciencia en la Secretaría del Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental.

-A la Lic. Marisa Tiveron, la Lic. Mariana Gomez Peña y el Lic. Claudio Bisioli, por su aliento y apoyo cotidiano en la tarea de escritura de esta Tesis.

-A los Sres. “Chacho” Speroni, Raul Castañón, Lucio Leguizamón, Juan Barrios y Hugo Asquel por toda su ayuda técnica para la obtención de muestras.

-Al Centro de Investigaciones Reproductivas Pérez Companc (CIRPC), por haberme permitido disponer de todos los elementos que posibilitaron el desarrollo de este trabajo.

-A la Fundación Margarita Pérez Companc por su apoyo financiero para poder realizar todos los experimentos que constituyen esta Tesis.



-A la Universidad de Buenos Aires, por seguir apostando a la formación superior en investigación.

-A todos mis amigos, por su afecto.

# INDICE

<b>Abreviaturas</b>	Pág. 1
<b>1. Introducción general</b>	Pág 5
<b>1.1. El espermatozoide: Breve descripción anatómica y funcional</b>	Pág. 5
1.1.1. Generalidades	Pág. 5
1.1.2. La capacitación del espermatozoide	Pág. 11
1.1.3. La hiperactivación	Pág. 21
1.1.4. La reacción acrosómica	Pág. 23
<b>1.2. El ácido gama-aminobutírico (GABA)</b>	Pág. 26
1.2.1. Biosíntesis y metabolismo	Pág. 26
1.2.2. Acciones del GABA en el Sistema Nervioso Central y en tejidos no neuronales	Pág. 29
<b>1.3. Receptores de GABA</b>	Pág. 31
1.3.1. Generalidades	Pág. 31
1.3.2. Diferentes tipos de receptores de GABA	Pág. 33
<b>1.4. Receptores GABA<sub>A</sub></b>	Pág. 34
1.4.1. Estructura	Pág. 34
1.4.2. Funcionamiento	Pág. 35
1.4.3. Propiedades farmacológicas	Pág. 37
<b>1.5. Receptores GABA<sub>B</sub></b>	Pág. 39
<b>1.6. Presencia de GABA y de las enzimas de su metabolismo en el oviducto y el útero</b>	Pág. 39
<b>1.7. Presencia de GABA en el ovario</b>	Pág. 44
1.7.1. Metabolismo del GABA en el ovario	Pág. 46

<b>1.8. Presencia de GABA en el aparato reproductor masculino</b>	Pág. 47
<b>2. Objetivos</b>	Pág. 52
<b>3. Materiales y métodos generales</b>	Pág. 53
<b>3.1. Materiales</b>	Pág. 53
3.1.1. Reactivos	Pág. 53
3.1.2. Anticuerpos	Pág. 53
3.1.3. Animales	Pág. 54
<b>3.2. Métodos</b>	Pág. 54
3.2.1. Colección de semen	Pág. 54
3.2.2. Evaluación de las muestras de semen	Pág. 54
3.2.3. Congelamiento y descongelamiento de semen	Pág. 55
3.2.4. Test de termorresistencia	Pág. 55
3.2.5. Capacitación <i>in vitro</i> de los espermatozoides de carnero	Pág. 56
<b>4. CAPITULO I: Puesta a punto de un analizador computarizado de imágenes para la evaluación de la movilidad de espermatozoides en muestras de semen de carnero y su aplicación en la determinación de los parámetros cinéticos espermáticos en muestras de semen frescas y congeladas/descongeladas</b>	Pág 57
<b>4.1. Introducción</b>	Pág. 57
<b>4.2. Métodos</b>	Pág. 61
4.2.1. Determinación de los parámetros cinéticos	Pág. 61
4.2.2. Determinación del número mínimo de campos y espermatozoides	Pág. 61
4.2.3. Determinación de errores de trayectoria	Pág. 62
4.2.4. Determinación de la velocidad de movilidad mínima del espermatozoide para ser considerado móvil	Pág. 62

4.2.5. Evaluación de los parámetros cinéticos de muestras de semen fresco y sus respectivos descongelados por el uso del CASA con la calibración propuesta	Pág. 63
4.2.6. Análisis estadísticos	Pág. 63
<b>4.3. Resultados</b>	Pág. 63
4.3.1. Determinación del número de campos y espermatozoides	Pág. 63
4.3.2. Diseño del arreglo de calibración para 60 cuadros por segundo	Pág. 64
4.3.3. Determinación de la correspondencia entre los valores de movilidad obtenidos en forma subjetiva y automatizada	Pág. 67
4.3.4. Evaluación de los parámetros cinéticos de muestras de semen fresco y sus respectivos descongelados por el uso del CASA con la calibración propuesta	Pág. 68
<b>4.4. Discusión</b>	Pág. 69
<b>5. CAPITULO II: Puesta a punto de una técnica de determinación del daño de membrana (integridad o viabilidad) en espermatozoides de carnero utilizando el diacetato de 6-carboxifluoresceína y el yoduro de propidio como fluorocromos</b>	Pág. 71
<b>5.1. Introducción</b>	Pág. 71
<b>5.2. Métodos</b>	Pág. 73
5.2.1. Colección de semen y su procesamiento	Pág. 73
5.2.2. Determinación de la integridad de membrana por el uso de diacetato de 6-carboxifluoresceína y yoduro de propidio	Pág. 74
5.2.3. Determinación de la viabilidad por el uso de fast-green	Pág. 74
5.2.4. Análisis estadísticos	Pág. 74
<b>5.3. Resultados</b>	Pág. 74

<b>5.4. Discusión</b>	Pág. 78
<b>6. CAPITULO III: Puesta a punto de una técnica de determinación del daño de la membrana acrosomal en espermatozoides viables de carnero utilizando simultáneamente lectinas marcadas con fluorocromo y el colorante Hoechst 33258</b>	Pág. 81
<b>6.1. Introducción</b>	Pág. 81
<b>6.2. Métodos</b>	Pág. 83
6.2.1 Determinación simultánea del patrón de unión de lectinas y la integridad de membrana	Pág. 83
6.2.2. Inducción de la exocitosis acrosomal por el uso de ionóforo de calcio A23187	Pág. 84
6.2.3. Especificidad de la unión de lectinas	Pág. 84
6.2.4. Determinación del estado acrosomal por el uso de microscopio de contraste de interferencia diferencial (DIC)	Pág. 84
6.2.5. Análisis estadísticos	Pág. 84
<b>6.3. Resultados</b>	Pág. 85
<b>6.4. Discusión</b>	Pág. 91
<b>7. CAPITULO IV: Puesta a punto de un método para evaluar capacitación de los espermatozoides utilizando clortetraciclina</b>	Pág. 95
<b>7.1. Introducción</b>	Pág. 95
<b>7.2. Métodos</b>	Pág. 96
7.2.1. Capacitación <i>in vitro</i>	Pág. 96
7.2.2. Inducción de la exocitosis acrosomal por el ionóforo de calcio A23187	Pág. 97
7.2.3. Marcación con clortetraciclina (CTC)	Pág. 97
7.2.4. Análisis de movilidad	Pág. 98
7.2.5. Análisis estadístico	Pág. 98

<b>7.3. Resultados</b>	Pág. 98
<b>7.4. Discusión</b>	Pág. 102
<b>8. CAPITULO V. Efecto del ácido gama-aminobutírico en la capacitación <i>in vitro</i> de espermatozoides de carnero.</b>	Pág. 105
<b>8.1. Introducción</b>	Pág. 105
<b>8.2. Métodos</b>	Pág. 106
8.2.1 Incubación de espermatozoides	Pág. 106
8.2.2 Análisis de movilidad y viabilidad espermática	Pág. 106
8.2.3. Inducción de la exocitosis acrosomal por el ionóforo de calcio A23187	Pág. 106
8.2.4. Ensayo de CTC	Pág. 107
8.2.5. Determinación del patrón de unión de lectina PSA	Pág. 107
8.2.6. Determinación del grado de fosforilación por inmunofluorescencia indirecta	Pág. 108
8.2.7. Análisis estadísticos	Pág. 108
<b>8.3. Resultados</b>	Pág. 108
<b>8.4. Discusión</b>	Pág. 124
<b>9. CAPITULO VI: Evidencia del papel del GABA oviductal en la capacitación de espermatozoides de carnero.</b>	Pág. 129
<b>9.1. Introducción</b>	Pág. 129
<b>9.2. Métodos</b>	Pág. 130
9.2.1. Muestras	Pág. 130
9.2.2. Capacitación <i>in vitro</i>	Pág. 130
9.2.3. Evaluación de la capacitación por unión de CTC	Pág. 131
9.2.4. Determinación de GABA por HPLC	Pág. 131

9.2.5. Desplazamiento de 3H-muscimol por fluido oviductal en un ensayo de radioreceptor (RR)	Pág. 131
9.2.6. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) y transferencia de bandas y detección con anticuerpo (immunoblots)	Pág. 132
9.2.7. Análisis estadísticos	Pág. 133
<b>9.3. Resultados</b>	Pág. 133
<b>9.4. Discusión</b>	Pág. 136
<b>10. Conclusión</b>	Pág. 140
<b>11. Publicaciones</b>	Pág. 141
11.1. Revistas	Pág. 141
11.2. Comunicaciones a congresos:	Pág. 142
<b>12. Bibliografía</b>	Pág. 144
<b>13. Apéndice: Soluciones y medios de cultivo</b>	Pág. 215

## ABREVIATURAS

A23187: Ionóforo de calcio A23187

ADN: Acido desoxiribonucleico

ALH: Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide respecto de su línea de avance

AMPC: Adenosina monofosfato cíclico

ANOVA: Análisis de Varianza

ATP: Trifosfato de adenosina

BME-eaas: Aminoácidos esenciales del medio de cultivo BME.

BSA: Albúmina Sérica Bovina

BSA-FAF: Albúmina Sérica Bovina sin ácidos grasos, Fracción V.

BSP: Proteínas del plasma seminal de bovinos

BWW: Medio Biggers, Whitten y Wittingham

BWW-m: Medio Biggers, Whitten y Wittingham modificado

Ca<sup>2+</sup>-ATPasas: Bombas Ca<sup>2+</sup>-ATPasas

Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATPasa: Bomba Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATPasa

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>: Concentración de calcio intracelular

CASA: Sistema de Análisis Automatizado de Espermatozoides

CFDA: Diacetato de 6-carboxifluoresceína

CGP35348: ácido 3-aminopropil(dietoximetil)fosfínico

CON: Concentración espermática

CTC: Clortetraciclina

DAG: Diacilglicerol

DHEAS: Dehidroepiandrosterona sulfato

dibutirilAMPC: Dibutiril monofosfato de adenosina cíclico

dibutirilGMPc: Dibutiril monofosfato de guanosina cíclico

DIC: Microscopio de contraste de interferencia diferencial

DMCM: metil6,7-dimetoxi-4-etil-β-carbolina-3-carboxilato

DMSO: Dimetilsulfóxido

DS: Desvío standard

ELISA: Inmunoensayo enzimático en fase sólida

FIV: Fecundación in vitro



FITC: Isotiocianato de fluoresceína  
FOC: Fluído oviductal completo  
FOF: Fluído oviductal filtrado  
FPP: Péptido promotor de fecundación  
G<sub>i</sub>: Proteínas de unión del nucleótido guanina inhibitorias  
GABA: Acido  $\gamma$ -aminobutírico  
GABA<sub>A</sub>: Receptor tipo A de ácido  $\gamma$ -aminobutírico  
GABA<sub>B</sub>: Receptor tipo B de ácido  $\gamma$ -aminobutírico  
GABA<sub>C</sub>: Receptor tipo c de ácido  $\gamma$ -aminobutírico  
GABA-T: GABAaminotransferasa o GABAaminotransaminasa  
GAD: Acido glutámico descarboxilasa  
GCS: Ganglios Cervicales Superiores  
GMPC: Monofosfato de guanosina cíclico  
GTP: Trifosfato de guanosina  
GTP $\gamma$ S: Guanosina 5'-O-(3-tiotrifosfato)  
HDL: Lipoproteínas de alta densidad  
Hepes: Acido (N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[etanolsulfónico])  
<sup>3</sup>H-GABA : Acido  $\gamma$ -aminobutírico tritiado  
<sup>3</sup>H-muscimol: Muscimol tritiado  
Hoeschst 33342: Bisbenzamida Hoeschst 33342  
Hoeschst 33258: Bisbenzamida Hoeschst 33258  
HOS: Test hipoosmótico  
HOST: Test hipoosmótico  
HPLC: Cromatografía líquida de alta performance  
HSA: Albúmina sérica humana  
IgG: Inmunoglobulina G  
KCl: Cloruro de potasio  
kDa: KiloDalton  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: Fosfato de potasio  
LH: Hormona luteinizante  
LHRH: Hormona liberadora de la hormona luteinizante  
LIN: Linealidad de la trayectoria  
MEM-neas: Aminoácidos no esenciales del medio de cultivo MEM

MOT: Porcentaje de espermatozoides móviles  
mV: milivoltio  
NAD: Nicotinamida adenina dinucleótido  
NAD(P)+: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato  
Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPasa: Bomba Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPasa  
NO: Oxido nítrico  
O<sub>2</sub><sup>-</sup>: Anión superóxido  
PBS: Solución salina de buffer fosfato  
pHi: pH intracelular  
PI: Yoduro de propidio  
PKA: Proteínquinasa dependiente de AMPc  
PKC: Proteínquinasa activada por calcio y fosfolípidos  
PLA2: Fosfolipasa A2  
PLP: Piridoxal-5-fosfato  
PNA: Aglutinina del *Arachis hypogea*  
PREG S: Sulfato de pregnanolona  
PSA: Aglutinina del *Pisum sativum*  
RA: Reacción acrosómica  
ROS: Especies reactivas de oxígeno  
RR: Ensayo de radioreceptor  
RSP: Preteínas del plasma seminal de carnero  
SDS: Dodecil sulfato sódico  
SDS-PAGE: Dodecil sulfato sódico en gel de poliacrilamida  
SH<sub>2</sub>: Grupo sulfhidrilo  
SNC: Sistema Nervioso Central  
SNP: Sistema Nervioso Periférico  
SOF: Fluído oviductal sintético  
SOF-m: Fluído oviductal sintético modificado  
SSA: Semialdehido succínico o succinato semialdehido  
SSADH: Semialdehido succínico deshidrogenasa  
TBPS: t-butilbiciclofosforotionato  
TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletildiamina  
TES: Acido (N-tris-[hidroximetil]metil-2-aminoetanolsulfónico]

THIP: 4,5,6,7 tetrahidroisoxazolo[5,4-c]piridin-3-ol

TK: Tirosinquinasa

TRIS: Tri(hidroximetil)metilamina

UV: ultravioleta

VAP: Velocidad media de la trayectoria

VCL: Velocidad curvilínea o de la trayectoria

VSL: Velocidad progresiva o rectilínea

WGA: Aglutinina del *Triticum vulgare*

ZP3: glicoproteína 3 de zona pelúcida

# **1. INTRODUCCION GENERAL**

## **1.1 EL ESPERMATOZOIDE: BREVE DESCRIPCIÓN ANATÓMICA Y FUNCIONAL**

### **1.1.1 Generalidades**

El espermatozoide es el producto final del proceso de gametogénesis que ocurre en el macho y que se desarrolla dentro de los túbulos seminíferos de los testículos (de Kretser y Kerr, 1994). Este proceso involucra una serie de divisiones mitóticas de las células espermatogoniales, una división meiótica que origina las espermátides, una extensa remodelación morfológica de estas espermátides durante la etapa denominada espermiogénesis, y la liberación de los espermatozoides formados al interior del lumen de los túbulos seminíferos, proceso denominado espermiación (Yanagimachi, 1994).

El proceso de espermatogénesis produce una célula que es altamente diferenciada en estructura y función, y capaz de combinarse con el oocito para comenzar el proceso que originará un nuevo individuo (Pedersen y Burdsal, 1994; Yanagimachi, 1994).

El espermatozoide de los mamíferos tiene dos componentes mayoritarios: la cabeza y el flagelo o cola, que están unidos por el cuello (Figura 1).

La cabeza de los espermatozoides de mamíferos contiene el núcleo y una estructura vesicular, el acrosoma, rodeados por componentes citoesqueletales y de citoplasma. El acrosoma está localizado en la parte anterior de la cabeza, cerca de la cara interna de la membrana plasmática, y está limitado por el núcleo posteriormente.

Los componentes citoesqueletales se disponen en el estrecho espacio entre el acrosoma y el núcleo, y entre el acrosoma y la membrana plasmática (Zamboni, 1992).

El núcleo del espermatozoide contiene sólo un miembro de cada par de cromosomas, la cromatina está altamente condensada, y su volumen es significativamente menor del correspondiente al núcleo de una célula somática. Está limitado por la envoltura nuclear, que es una estructura de doble membrana. La organización, la cantidad de ADN, los arreglos y la composición de nucleoproteínas son características únicas del núcleo del espermatozoide (Ward y Coffey, 1991; Fuentes Mascorro y col., 2000; Mudrak y col., 2005).

Las estructuras citoesqueletales están constituidas por el citoesqueleto subacrosomal y el citoesqueleto postacrosomal (Zamboni, 1992). El citoesqueleto subacrosomal está

ubicado entre el acrosoma y el núcleo; y el citoesqueleto postacrosomal se encuentra entre el núcleo y la membrana plasmática posterior al acrosoma. A los citoesqueletos subacrosomales y postacrosomales se los suele llamar teca perinuclear (Bellvé y O'Brien, 1983; Bellvé y col., 1992).

Los componentes del citoesqueleto de la cabeza del espermatozoide podrían tener un papel estructural en la definición de la forma de la cabeza del espermatozoide (Clermont y col., 1955; Yanagimachi y Noda, 1970) y un papel funcional ayudando a la penetración del oocito y sus envolturas por parte del espermatozoide en el momento de la fecundación (Olson y col., 1983; Czaker, 1985).

El acrosoma se origina a partir del aparato de Golgi en las espermátidas y contiene las enzimas necesarias para que el espermatozoide pueda penetrar a través de las envolturas del oocito y llevar a cabo la fecundación. Esta estructura membranosa se ubica como un capuchón por encima del núcleo en la parte anterior de la cabeza del espermatozoide (Figuras 1 y 2).

La membrana acrosomal interna recubre la parte anterior de la membrana externa del núcleo y se continúa con la membrana externa del acrosoma, que se dispone muy cerca de la superficie interna de la membrana plasmática de la región anterior de la cabeza del espermatozoide.

A pesar de que ha sido descrito como un lisosoma especializado (Allison y Hartree, 1970), el acrosoma también tiene características de una vesícula secretora regulada (Abou-Haila y Tulsiani, 2000). Durante el proceso de lisis del acrosoma, conocido como reacción acrosómica, el contenido acrosomal es liberado (Yanagimachi, 1994). Luego de la liberación y activación de las enzimas acrosomales, el espermatozoide penetra la zona pelúcida que rodea al oocito (Stambaugh y col., 1969; Beyler y Zaneveld, 1982).

Los componentes mejor caracterizados del acrosoma son la proacrosina y la hialuronidasa (Brown, 1981; Topfer-Petersen y col., 1990; Howes y Jones, 2002). La conversión de proacrosina en acrosina (la enzima activa) ocurre durante la reacción acrosómica (Mukerji y Meizel, 1975; Polakoski y Parrish, 1977; Tobias y Schumacher, 1977; Brown y Harrison, 1978; Müller-Esterl y Fritz, 1981).

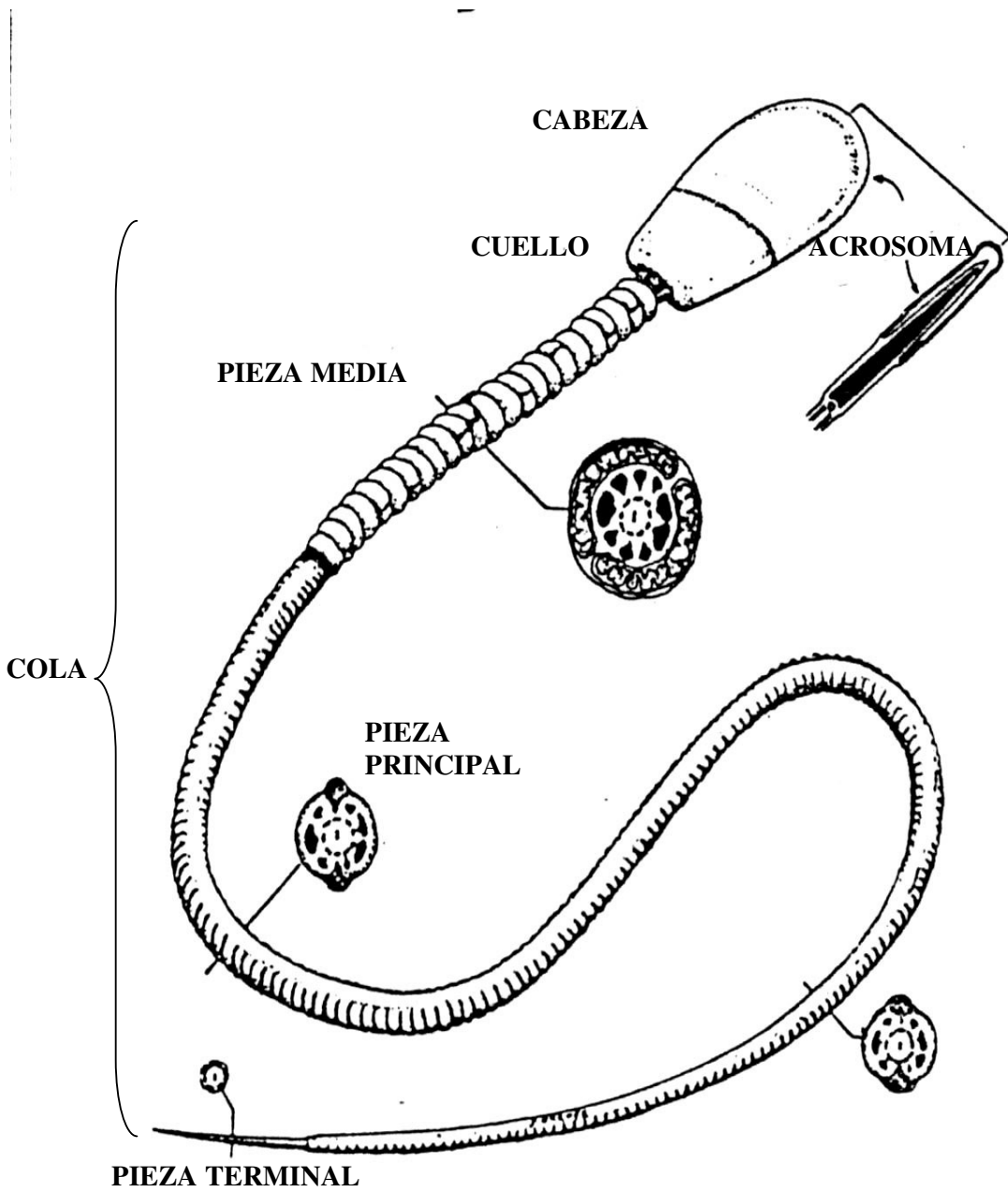


Figura 1. Componentes principales del espermatozoide de mamíferos.  
Adaptado de Garner y Hafez, 1992.

Otras proteínas identificadas como constituyentes acrosomales en distintas especies y que podrían actuar durante la reacción acrosómica incluyen a las proteínas de unión del nucleótido guanina inhibitorias (Gi) (Garty y col., 1988; Glassner y col., 1991; Schuffner y col., 2002), ciclinas y proteinquinasas que fosforilan en residuos serina o treonina (Naz y col., 1993), actina (Dvorakova y col., 2001), calmodulina (Jones y col., 1980; Weinman y col., 1986; Camatini y col., 1991; Hernandez y col., 1994), espectrina (Virtanen y col., 1984; Dvorakova y col., 2001),  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulinas (Palecek y col., 1999; Dvorakova y col., 2001), acrogranina (Anakwe y Gerton; 1990), la proteína haprin (Kitamura y col., 2005a,b) y fertilina (Hunnicutt y col., 1997; Ding y col., 2001). Una característica única del espermatozoide es que su membrana plasmática está subdividida en dominios o regiones bien definidos que difieren en función y composición (Eddy y Koehler, 1982; Martinez y Morros, 1996; Toshimori, 1998).

Las evidencias de que la organización y la composición de la membrana plasmática varían entre las diferentes regiones de la superficie del espermatozoide llevó al concepto de que la membrana plasmática del espermatozoide es un mosaico de dominios restringidos, que reflejan las funciones especializadas de los componentes citoplasmáticos y de superficie del espermatozoide (Fawcett, 1975; Koehler, 1978; Friend, 1982; Primakoff y Myles, 1983; Holt, 1984). Estos dominios son de tipo dinámico y sufren cambios de organización y composición durante la vida de la célula (Bearer y Friend, 1990). Se sabe que las interacciones lípido-lípido son responsables en gran medida de las asociaciones particulares presentes en la membrana (Wolf y col., 1988).

Además, debido a que las proteínas transmembranosas están estabilizadas por unión con proteínas esqueléticas de membrana a estructuras citoesqueléticas (Burrige y Feramisco, 1982; Marchesi, 1985), estas asociaciones podrían ser importantes para definir los límites y contenidos de diferentes dominios de superficie de los espermatozoides (Baker y col., 2002). Los componentes del citoesqueleto de la membrana que estarían involucrados en la formación de dominios incluyen a la actina, la  $\alpha$ -actinina, las  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulinas, la miosina, la tropomiosina, la espectrina, la citoqueratina, la vimentina, la fertilina y la calmodulina, entre otros (Clarke y Yanagimachi, 1978; Peterson y col., 1978; Talbot y Kleve, 1978; Campanella y col., 1979; Tamblin, 1980; Clarke y col., 1982; Virtanen y col., 1984; Welch y O'Rand,

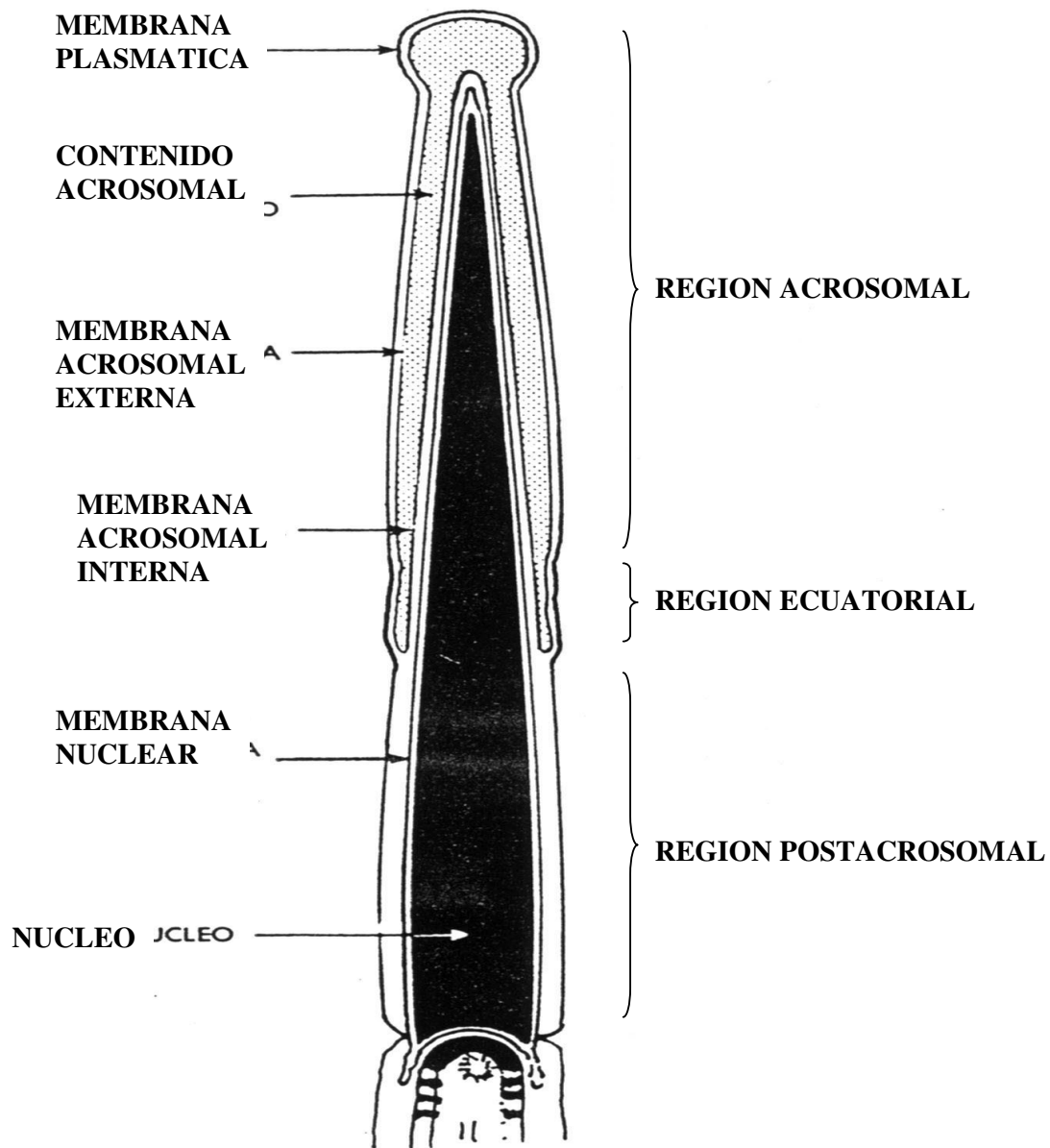


Figura 2. Regiones de la membrana plasmática y estructura de la cabeza del espermatozoide de mamífero. Adaptado de Garner y Hafez, 1992.



1985; Flaherty y col., 1986; De Cesaris y col., 1989; Camatini y col., 1991; Yagi y Paranko, 1995; Palecek y col., 1999; Cowan y col., 2001; Cuasnicu y col., 2001; Ding y col., 2001; Dvorakova y col., 2001).

Los dominios o regiones más importantes de la membrana plasmática en la cabeza del espermatozoide de la mayoría de los mamíferos son la región acrosomal (anterior de la cabeza) y la región postacrosomal (posterior de la cabeza) (Figura 2).

El flagelo o cola de los espermatozoides de mamíferos consiste en 3 segmentos distintos, y se une a la cabeza del espermatozoide por la pieza conectora o cuello. Estos segmentos son: la pieza media, la pieza principal y la pieza terminal (Fawcett, 1965). Los componentes estructurales mayoritarios dentro del flagelo del espermatozoide de mamíferos son el axonema, la hoja mitocondrial, las fibras densas externas, y la hoja fibrosa. Las fibras densas externas y la hoja fibrosa forman el citoesqueleto del flagelo (Fawcett, 1975).

El axonema está compuesto por un complejo de microtúbulos con una disposición "9 + 2" que se extienden a lo largo de la pieza media y principal del flagelo. Rodeando externamente al axonema desde la pieza conectora hasta la parte posterior de la pieza principal encontramos a las fibras densas externas (Bacetti y col., 1976). Adicionalmente, la pieza media contiene la hoja mitocondrial. Esta hoja mitocondrial está formada por mitocondrias que se ubican entre la membrana plasmática y las fibras densas externas. En la pieza principal, la hoja fibrosa se ubica entre la membrana plasmática y las fibras densas externas (Curry y Watson, 1995). En la pieza terminal de la cola sólo la hoja fibrosa rodea al axonema.

El flagelo, como la cabeza, está rodeado por la membrana plasmática y contiene poco citoplasma. El flagelo provee la fuerza mótil necesaria para que el espermatozoide alcance la superficie del oocito y lleve a cabo la fecundación. Los distintos elementos del flagelo generan y forman las ondas de curvatura que produce esta fuerza y las propagan desde la base hasta el final.

A pesar de que todos los espermatozoides de mamíferos tienen estas características generales, hay diferencias especie-específicas en el tamaño y forma de la cabeza, y en el largo y el tamaño relativo de los componentes del flagelo. La estructura especializada del espermatozoide refleja su actividad funcional (Eddy y O'Brien, 1994; Mortimer, 1997).

### **1.1.2. La capacitación del espermatozoide**

Los espermatozoides son células muy particulares que sufren una serie de procesos de maduración a lo largo de su vida, resultantes de su interacción con los diferentes ambientes a través de los cuales migran.

En el epidídimo, los espermatozoides adquieren la potencialidad para moverse y fecundar por interacción con los fluidos luminales. Al momento de ser eyaculados, adquieren motilidad y son “condicionados” por los constituyentes del fluido seminal a pesar de que aún no son capaces de fecundar. Durante su migración a través del tracto genital femenino, los espermatozoides sufren una serie de cambios, que en conjunto se los denomina capacitación, que los hacen capaces de unirse a la zona pelúcida, sufrir la reacción acrosómica y, finalmente, fusionarse con el oocito (Yanagimachi, 1994; De Jonge, 2005).

La capacitación es un proceso reversible; esto significa que tratando a los espermatozoides capacitados con determinadas sustancias o fluidos biológicos, como el plasma seminal, se reduce su capacidad para fecundar oocitos (Bedford y Chang, 1962; Martins y col., 2003; Nixon y col., 2006).

El lugar donde los espermatozoides se capacitan varía entre especies. En especies en las que el semen es depositado en el útero durante el coito (ej. cerda, yegua, perra y algunos roedores), los espermatozoides completan totalmente o la mayor parte de la capacitación en el segmento inferior del istmo, donde los espermatozoides fecundantes permanecen “almacenados” (Suarez, 1987; Smith y Yanagimachi, 1991; Yanagimachi, 1994). En las especies en las que los espermatozoides son depositados en la vagina durante la cópula (ej. vaca, oveja, coneja y primates), la capacitación de los espermatozoides puede comenzar mientras pasan a través del moco cervical (Yanagimachi, 1994) y completarse en el istmo oviductal (Cooper y col., 1979; Hunter y Wilmut, 1984; First y Parrish, 1987).

Una serie de modelos animales experimentales han sido extensamente utilizados para estudiar la capacitación in vivo. Entre ellos figuran el hamster (Smith y col., 1987), el ratón (Demott y Suarez, 1992), el conejo (Suarez y col., 1983), el carnero, el cerdo y el toro (Hunter, 1987). Estas investigaciones tienen la ventaja de ser relevantes desde el punto de vista fisiológico porque siguen el transporte de los espermatozoides y sus

modificaciones en el espacio real y al tiempo correspondiente. De todos modos, como la capacitación ocurre internamente dentro del tracto femenino, estos experimentos tienen la desventaja de ser costosos y difíciles de llevar a cabo. Además, el bajo número de espermatozoides que abandonan el oviducto y llegan al sitio de fecundación (Suarez y col., 1992) no permite hacer mediciones cuantitativas de parámetros bioquímicos de los espermatozoides. Por estas razones, a pesar de sus desventajas, varios modelos *in vitro* han sido desarrollados en especies como el ratón (Toyoda y col., 1971), hamster (Yanagimachi, 1982), conejo (Young y Bodt, 1994), cerdo (Suarez y col., 1992), toro (Parrish y col., 1988), mono (Wolf y col., 1989) y humanos (Burkman, 1990) para estudiar la capacitación, sus requerimientos, características y mecanismos.

El evento bioquímico mejor caracterizado que ocurre durante la capacitación en espermatozoides de mamíferos es el aumento de la concentración de calcio intracelular  $[Ca^{2+}]_i$  (Zhou y col., 1990; Baldi y col., 1991; Breitbart, 2002; Marin-Briggiler y col., 2003).

En la regulación de la entrada de  $Ca^{2+}$  en espermatozoides se han propuesto tres mecanismos que podrían estar involucrados en el proceso de capacitación:

1) Canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje: Estos permiten un aumento rápido de la concentración de  $Ca^{2+}$ . No obstante, la lenta cinética del aumento de  $[Ca^{2+}]_i$  durante la capacitación (90 a 120 minutos) es poco compatible con la participación de este tipo de canales (Florman y col., 1992; Fraser, 1995a, 1998a; Gonzalez-Martinez y col., 2002).

A pesar de ello, algunos autores (Fraire-Zamora y Gonzalez-Martinez, 2004; Neri-Vidaurre y col., 2006) los han involucrado en el aumento de  $[Ca^{2+}]_i$  como consecuencia del aumento del  $pH_i$  que ocurre durante la capacitación.

2)  $Ca^{2+}$ -ATPasas: Estas enzimas mantienen baja la  $[Ca^{2+}]_i$  por el bombeo de  $Ca^{2+}$  hacia el exterior de la célula (Schatzmann, 1982). Existen evidencias indirectas de que este tipo de bombas estarían involucradas en la regulación de la  $[Ca^{2+}]_i$  en espermatozoides de cobayo, hamster, ratón, toro y humanos (Roldán y Flemming, 1989; Fraser y McDermott, 1992; DasGupta y col., 1994; Fraser, 1995b; Perry y col., 1997; Dorval y col., 2002; Feng y col., 2006). También se ha sugerido que los factores decapacitantes adsorbidos sobre la membrana del espermatozoide activarían una  $Ca^{2+}$ -ATPasa y evitarían un incremento en la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular (Adeoya-Osiguwa y Fraser, 1996) y una capacitación prematura (Fraser, 1995a). Así, la pérdida de estos factores decapacitantes durante la incubación, causaría un descenso en la actividad de la

Ca<sup>2+</sup>-ATPasa, y consecuentemente, un aumento del Ca<sup>2+</sup> intracelular (Fraser y McDermott, 1992; Adeoya-Osiguwa y Fraser, 1993,1994). También han sido propuestos como reguladores de la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa algunos lípidos como la lisofosfatidilcolina (inhibidor) y la lisofosfatidilserina (activador) (Roldán y Flemming, 1989), y proteínas como la calmodulina (Leclerc y col., 1992; Adeoya-Osiguwa y Fraser, 1993; DasGupta y col., 1994; Leclerc y Goupil, 2000; Si y Olds-Clarke, 2000). En espermatozoides de toro y carnero, Dragileva y col. (1999) sugirieron la acción de una Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATPasa en la regulación del [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>.

3) Intercambiadores de Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>: A partir de estudios realizados en espermatozoides de toro, se hipotetizó que la actividad de este intercambiador sería inhibida por la caltrina, una proteína de bajo peso molecular que se incorpora al espermatozoide cuando este se pone en contacto con el plasma seminal (Rufo y col., 1984). Durante la capacitación, esta proteína se perdería llevando a un aumento en [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>.

Durante la capacitación, el Ca<sup>2+</sup> podría hallarse involucrado en la estimulación de la adenilato ciclasa (Rojas y col., 1992; Parinaud y Milhet, 1996), de la fosfolipasa A<sub>2</sub> (Roldán y Vazquez, 1996; Shi y col., 2005), y de la proteína quinasa C (Furuya y col., 1993). Además, no se descarta una interacción directa con fosfolípidos, alterando la estructura de la membrana (Holt, 1995). Sin embargo, no es tan clara la función del Ca<sup>2+</sup> extracelular en la regulación de la fosforilación en tirosina de proteínas (Visconti y col., 1995a; Luconi y col., 1996; Emiliozzi y Fenichel, 1997; Kalab y col., 1998; Baker y col., 2004).

Si bien los requerimientos de sodio y potasio durante la capacitación no han sido ampliamente estudiados, se sabe que bajas concentraciones de Na<sup>+</sup> son necesarias para la capacitación del espermatozoide de cobayo (Hyne y col., 1984) y que la pequeña entrada de Na<sup>+</sup> que ocurre durante la capacitación en espermatozoides de ratón estaría regulada por una Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPasa (Fraser, 1983). Recientemente, García y Meizel (1999a) postularon para espermatozoides humanos que la regulación del pH intracelular durante la capacitación dependería del Na<sup>+</sup> y que en la regulación estarían involucrados intercambiadores Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>. En el caso de espermatozoides de ratón, Demarco y col. (2003) postularon la regulación de la capacitación por cotransportadores Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, mientras que en el caso de espermatozoides de bovinos, Thundathil y col. (2006) involucraron a Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPasas en la despolarización de membrana que ocurre durante la capacitación. Por otra parte, la capacitación de espermatozoides de ratón y toro fue

asociada con un incremento en la permeabilidad a los iones  $K^+$ , que serían los responsables de la hiperpolarización observada en la membrana (Zeng y col., 1995). Asociado a la despolarización de la membrana por  $K^+$  se ha sugerido un aumento del  $[Ca^{2+}]_i$  por efecto de canales de calcio dependientes de voltaje (Fraire-Zamora y Gonzalez-Martinez, 2004). De todos modos, los resultados obtenidos hasta hoy no son lo suficientemente convincentes como para aceptar definitivamente esta hipótesis.

El papel del cloro ( $Cl^-$ ) en la reacción acrosómica inducida por progesterona en espermatozoides humanos (Wistrom y Meizel, 1993; Calogero y col., 1999; Patrat y col., 2002), de ratón (Shi y Roldán, 1995a) y de cerdo (Melendrez y Meizel, 1995) podría estar asociado a la existencia de un receptor de ácido gamma-aminobutírico de tipo A ( $GABA_A$ ) (Ritta y col., 1998). García y Meizel (1999b) postularon que durante la capacitación de espermatozoides humanos la concentración intracelular de  $Cl^-$  sería lo suficientemente elevada como para permitir la apertura de canales de  $Cl^-$  y la salida de este ion, resultando en una despolarización de la membrana. Sin embargo, este mecanismo de acción del  $Cl^-$  no está ampliamente aceptado.

Los espermatozoides humanos adquieren el bicarbonato que necesitan del plasma seminal al momento de ser eyaculados (Okamura y col., 1986) por un mecanismo mediado por difusión de  $CO_2$  y acción de la anhidrasa carbónica (Parkkila y col., 1991) o bien a través de transportadores iónicos (Okamura y col., 1988; Visconti y col., 1990). Este  $HCO_3^-$  estaría implicado en el aumento del pH intracelular asociado a la capacitación (Fraser, 1995b; Gadella y van Gestel, 2004) y en una acción sobre la arquitectura lipídica de la membrana del espermatozoide (Harrison y col., 1996; Gadella y Harrison, 2000,2002; Harrison y Gadella, 2005). El  $HCO_3^-$  actuaría también estimulando la adenilato ciclasa por acción directa sobre esta enzima (Okamura y col., 1985; Garty y Salomon, 1987; Rojas y col., 1992; Visconti y col., 1995b; Breitbart, 2002). A pesar de ello, el mecanismo por el cual el AMPc afecta diversas funciones celulares, no está todavía completamente claro (Harrison y Gadella, 2005). Estas señales se propagarían a través de fosforilaciones específicas de proteínas por medio de quinasas dependientes de AMPc (Harrison, 1996; Gadella y Harrison, 2000; Harrison y Miller, 2000; Demarco y col., 2003; Galantino-Homer y col., 2004; Hess y col., 2005).

El Zinc ( $Zn^{2+}$ ) está presente en una alta concentración en el plasma seminal de humanos, y aparece como un estabilizador de la membrana del espermatozoide, por lo que puede ser considerado como un factor decapacitante (Andrews y col., 1994). En espermatozoides de hamster y ratón, el  $Zn^{2+}$  inhibe la capacitación pero no afecta la reacción acrosómica (Aounuma y col., 1981; Andrews y col., 1994).

El uso de fluorocromos que se unen específicamente al  $Zn^{2+}$  permitió determinar que el  $Zn^{2+}$  es eliminado del espermatozoide durante la capacitación, al menos en el hamster. A pesar de estos resultados, la remoción del  $Zn^{2+}$  no alcanza por sí sólo para inducir la capacitación, y estaría involucrado en el proceso de desestabilización que sufre la membrana durante la capacitación y relacionado con otros eventos asociados (Andrews y col., 1994).

Durante la capacitación, los mayores cambios se producen a nivel de la membrana. Los componentes que la recubren originarios del epidídimo (Boué y col., 1996) y del plasma seminal (Cross, 1996), son removidos (Barrios y col., 2005) o alterados (De Jonge, 2005). Hay relocalización de glicoproteínas y antígenos (Cohen-Dayag y Eisenbach, 1994; Focarelli y col., 1995), se activan o inhiben mecanismos de flujo de iones a través de la membrana, y se incrementa la fluidez de la misma (Yanagimachi, 1994) como consecuencia de las modificaciones de la composición lipídica (Benoff, 1993).

Así, durante la capacitación, una serie de antígenos de membrana, muchos de los cuales han sido identificados, cambian su distribución, aparecen o desaparecen (Berger, 1990; Cohen-Dayag y Eisenbach, 1994, Grace y col., 2002). A pesar de ello, poco o nada se sabe de su función durante este proceso.

En espermatozoides humanos, una proteína denominada P34H (P26h en hamster, Berube y col., 1996) es secretada en el epidídimo (Boué y col., 1996), enmascarada durante la eyaculación, reaparece durante la capacitación y es eliminada durante la reacción acrosómica. Los anticuerpos anti-P34H inhiben la interacción espermatozoide-zona pelúcida, sugiriendo que podría tratarse de un potencial receptor para la zona pelúcida (Boué y col., 1994). En el caso de espermatozoides de ratón, una glicoproteína denominada DE (37 kDa) sufre relocalización durante la capacitación (Rochwerger y Cuasnicu, 1992).

Otros factores, provenientes del epidídimo o del plasma seminal, se modifican durante la capacitación. Así, en espermatozoides de toro, algunas proteínas pertenecientes a la familia de las denominadas BSP (Proteínas del plasma seminal bovino, Bovine Seminal

Plasma) unirían moléculas de fosfatidilcolina y favorecerían la inducción de la capacitación (Thérien y col., 1995; Salois y col., 1999). Se ha hipotetizado que estas BSP se perderían durante la capacitación y colaborarían en el proceso de extracción de colesterol y fosfolípidos de la membrana del espermatozoide (Thérien y col., 1995,1999; Anbazhagan y Swamy, 2005). Además, Lane y col. (1999) demostraron que estas BSP potencian la capacitación de espermatozoides de toro inducida por heparina y lipoproteínas de alta densidad (HDL, high-density lipoprotein) (Thérien y col., 1997) aunque por mecanismos diferentes. En espermatozoides epididimarios de bovinos, el agregado de BSP y HDL indujeron la pérdida de colesterol de la membrana espermática (Thérien y col., 1998). Este tipo de proteínas también fueron identificadas en plasma seminal de carnero y se las denomina RSP (Bergeron y col., 2005). Adicionalmente, Adeoya-Osiguwa y col. (1998) en espermatozoides de ratón, Fraser (1998b), Fraser y Adeoya-Osiguwa (2001) y Green y col. (1996a) en espermatozoides humanos y Funahashi y col. (2000) en espermatozoides de cerdo, propusieron que el denominado péptido promotor de fecundación (FPP), que se lo encuentra en el plasma seminal, induce la capacitación de espermatozoides de ratón a través de su interacción con un receptor de membrana denominado TCP-11 (Fraser y col., 1997) y que dicha interacción modularía la actividad de una adenilatociclasa (Green y col., 1996b; Fraser, 1998b; Adeoya-Osiguwa y Fraser, 2000; Fraser y col., 2005).

El colesterol y el sulfato de colesterol presentes en la membrana de los espermatozoides (Suzuki y Yanagimachi, 1989) limitan la permeabilidad iónica de la misma y la inserción y movilidad de las proteínas dentro de la bicapa lipídica, brindando de este modo una mayor rigidez y estabilizando la membrana (Parks y Ehrenwald, 1990; Nimmo y Cross, 2003). Al mismo tiempo, previenen algunos fenómenos asociados con la capacitación espermática (Travis y Kopf, 2002). La desulfatación del sulfato de colesterol en el tracto reproductivo femenino y su posterior eliminación de la membrana, junto con cambios en la simetría de los lípidos, cambiarían dramáticamente las propiedades biofísicas de la membrana, tornándola más fusogénica (Nolan y Hammertedt, 1997; Purohit y col., 1999). Así, la incubación en medios que contienen albúmina, que actúa extrayendo colesterol (Cross, 1998) o con fluidos foliculares u oviductales favorece la pérdida de colesterol y la consiguiente capacitación (Davis y col., 1979; Huneau y col., 1994; de Lamirande y col., 1997).

Hoy se considera que la alta concentración de colesterol presente en el plasma seminal, cuya función sería la de mantener altos los niveles de colesterol en la membrana del espermatozoide, podría ser el factor más importante en la inhibición de la capacitación (Davis, 1978; Cross, 1996).

Algunos autores hipotetizan que esta pérdida de colesterol u otros componentes (Tollner y col., 2004) es necesaria para la exposición de determinados antígenos o sitios ligandos (Belmonte y col., 2005) que liberarían o expondrían moléculas que interactuarían con las moléculas de reconocimiento presentes en la zona pelúcida (Benoff y col., 1993a,b). En particular, estos autores postularon que la liberación de colesterol llevaba a la exposición en la superficie del espermatozoide de un receptor para manosa. Sin embargo, esta hipótesis está hoy fuertemente cuestionada (Chen y col., 1995; Youssef y col., 1997). Por otra parte, otros autores (Cross y Razy-Faulkner, 1997; Cross, 1998) postularon que la pérdida de colesterol es una de las tantas causas que producen un aumento del pH intracelular del espermatozoide en humanos. Visconti y col. (1998, 1999) señalaron que la pérdida de colesterol estaría íntimamente ligada con las señales que resultan en la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina.

Por otra parte, durante la capacitación ocurren otras modificaciones de la membrana. Estudios hechos en ratón y toro indicaron que durante la capacitación, la membrana del espermatozoide empieza a hiperpolarizarse (Zeng y col., 1995; Demarco y col., 2003). El descenso en el potencial de membrana (de -30 mV en espermatozoides no capacitados a -60 mV en aquellos capacitados) parecería deberse a un aumento de la permeabilidad para los iones  $K^+$  (Zeng y col., 1995) o  $HCO_3^-$  (Demarco y col., 2003) y sería esencial para la posterior reacción acrosómica inducida por zona pelúcida. El mecanismo involucraría la inactivación y activación de canales de calcio dependientes de voltaje o a cotransportadores  $Na^+/HCO_3^-$  (Demarco y col., 2003). Los primeros podrían ser abiertos por la acción de un agonista inductor de despolarización como zona pelúcida (Arnoult y col., 1996, 1999; Florman y col., 1998; Linares-Hernandez y col., 1998). En contraposición con estos resultados, García y Meizel (1999b) establecieron que los espermatozoides humanos capacitados tienen un potencial de membrana de -31 o -17 mV (medidos por dos metodologías) y en estas condiciones, se podría producir la apertura de canales pasivos de cloro y la siguiente despolarización de membrana y salida de iones cloro. Los valores establecidos por estos autores difieren levemente de los previamente medidos por Calzada y col. (1988, 1991) y Calzada y Tellez (1997)



(- 69 mV para espermatozoides no capacitados y -39 mV para espermatozoides capacitados).

Los espermatozoides humanos incubados bajo condiciones aeróbicas generan las llamadas especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo, entre otros (Alvarez y col., 1987). Mientras que altas concentraciones de ROS son nocivas para los espermatozoides, concentraciones bajas controladas estarían involucradas en la adquisición de la capacidad fecundante de los mismos (de Lamirande y Gagnon, 1995a, 2003; Aitken y col., 1996; Zhang y Zheng, 1996; de Lamirande y col., 1998; Baumber y col., 2003; O'Flaherty y col., 2003; Villegas y col., 2003; Ford, 2004; Rivlin y col., 2004; O'Flaherty y col., 2006). También se ha involucrado al óxido nítrico (NO) en la capacitación, ya que concentraciones bajas de éste promueven la capacitación en espermatozoides humanos (Zini y col., 1995; Herrero y col., 1999, 2000; Thundathil y col., 2003; O'Flaherty y col., 2006), de rata (Aitken y col., 2004), de hamster (Kameshwari y col., 2003) y de bovinos (O'Flaherty y col., 2004a; Rodriguez y col., 2005).

Otro elemento importante a considerar durante la capacitación fue establecido por Breitbart y Spungin (1997), Breitbart (2003), Brener y col. (2003) y Breitbart y col. (2005). Estos autores postularon la formación de una malla de actina filamentosa (actina F) durante la capacitación en las membranas plasmática y acrosomal externa del espermatozoide. Esta malla estabilizaría estas dos membranas, previniendo su fusión prematura. Además, esta polimerización estaría regulada por PKA, PKC y fosfolipasa D (PLD) (Cohen y col., 2004; Breitbart y col., 2006).

Mientras que los mecanismos de trasducción de señales han sido ampliamente estudiados para la reacción acrosómica (Doherty y col., 1995), se sabe poco de ellos en la capacitación.

Hasta el momento, hay evidencias que indican que el  $Ca^{2+}$ , ROS, AMPc, proteinquinasas y proteinfosfatasas (para residuos de serina, treonina y tirosina de proteínas) estarían involucrados en la capacitación de espermatozoides humanos. La relación que existe entre estos moduladores no está bien establecida y probablemente se trate de un mecanismo complejo.

La entrada de  $Ca^{2+}$  y la producción de ROS son los primeros eventos que ocurren durante la capacitación de espermatozoides humanos (de Lamirande y Gagnon, 1995b).

Estos dos procesos podrían ser responsables de la activación fisiológica de la adenilato ciclasa, que podría tener un papel importante durante la capacitación. Así, sustancias que contribuyen al aumento de la concentración intracelular de AMPc, como la forskolina (un activador de la adenilato ciclasa), el dibutililAMPc (un análogo del AMPc permeable a la célula), el NECA (5'-N-etil-carboxamidoadenosina, un agonista de la adenosina con especificidad para los receptores A2) (Fraser, 1990; Fenichel y col., 1996), el FPP (Adeoya-Osiguwa y col., 1998; Fraser, 1998b), la calcitonina (Adeoya-Osiguwa y Fraser, 2003), la cafeína y la isobutilmetilxantina (inhibidores de la fosfodiesterasa), estimulan la capacitación (Leclerc y col., 1997).

También sería posible que las ROS participaran en la activación de la adenilato ciclasa del espermatozoide (de Lamirande y col., 1997) o bien que inhibieran las fosfodiesterasas espermáticas durante la capacitación (Lefièvre y col., 1999).

Las quinasas más estudiadas y que estarían involucradas durante la capacitación son de cuatro tipos: a) las quinasas activadas por el sistema  $Ca^{2+}$ -calmodulina (Marin-Briggiler y col., 2005); b) las quinasas dependientes de AMPc (PKA) (Harrison, 2004; Breitbart y col., 2006); c) las proteinquinasas activadas por calcio y fosfolípidos (PKC) (Furuya y col., 1993; O'Flaherty y col., 2005), que fosforilan proteínas en residuos serina y treonina y d) las tirosinquinasas, que fosforilan proteínas en residuos tirosina (Baldi y col., 1996; Naz y Rajesh, 2004; Nixon y col., 2005).

En el ratón (Visconti y col., 1995a,b), en humanos (Leclerc y col., 1996; O'Flaherty y col., 2004b), en bovinos (Galantino-Homer y col., 1997), en felinos (Pukazhenthil y col., 1998) y en equinos (Pommer y col., 2003) los inhibidores de la PKA bloquean la capacitación y la fosforilación en tirosina de proteínas asociada a esta capacitación, indicando que la PKA se encuentra implicada en este proceso (Visconti y col., 1997). Sin embargo, esto no está tan aceptado en espermatozoides de cerdo (Tardif y col., 2004). El tratamiento con dibutililGMPc también estimula la capacitación de espermatozoides de ratón (Furuya y col., 1992), sugiriendo un posible papel de la guanilato ciclasa y el GMPc en este proceso.

Por otra parte, el efecto de sustancias como los ésteres de forbol en la fosforilación de proteínas y en la capacitación de espermatozoides, así como la reversión de dicho efecto por inhibidores de proteinquinasas, podrían indicar que la PKC estaría involucrada en la capacitación (Furuya y col., 1993).

Asociada a la capacitación, la fosforilación de proteínas dependiente de AMPc es un requisito previo para la fosforilación en tirosina de proteínas. En 1991, Naz y col. observaron la fosforilación en tirosina de proteínas de membrana de espermatozoides humanos durante la capacitación, con un cambio progresivo en la localización de las proteínas fosforiladas en tirosina desde el flagelo hacia la región acrosómica.

Los patrones de fosforilación en tirosina asociados a la capacitación han sido descritos en espermatozoides de ratón (Leyton y Saling, 1989a; Duncan y Fraser, 1993; Visconti y col., 1995a,b), bovino (Galantino-Homer y col., 1997), ovino (Pérez-Pe y col., 2002), hamster (Brewis y col., 1998; Kulanand y Shivaji, 2001), humano (Aitken y col., 1995; Luconi y col., 1995,1996; Carrera y col., 1996; Leclerc y col., 1996,1997; Emiliozzi y Fenichel, 1997; Liu y col., 2006; O'Flaherty y col., 2006), gato (Pukazhenthí y col., 1996a), equino (Pommer y col., 2003), cerdo (Dube y col., 2003, 2005; Bravo y col., 2005), dos especies de marsupiales (Sidhu y col., 2004), tigre y dos especies de leopardo (Pukazhenthí y col., 1998). Tomes y col. (1998), describieron la inhibición de la fosforilación de proteínas en residuos tirosina por acción del plasma seminal en espermatozoides humanos.

Los factores descritos anteriormente, como la entrada de  $Ca^{2+}$ , la generación de ROS, el incremento en la actividad de adenilato ciclasa y la fosforilación de proteínas también están involucrados en la reacción acrosómica (Yanagimachi, 1994; Aitken y col., 1995; Doherty y col., 1995). Es por eso que la capacitación puede ser considerada como un evento preparatorio en el que distintos sistemas celulares adquieren un nivel de activación para luego producir la reacción acrosómica.

Harrison (1996) propuso que la capacitación no es un proceso limitado que culmina en un estado celular definido, sino más bien un proceso continuo de desestabilización positiva que, eventualmente, lleva a la muerte celular. Así, bajo condiciones ambientales específicas, el proceso molecular que lleva a la capacitación se activa y ocurren una serie de eventos que aumentan progresivamente el grado de desestabilización de la membrana plasmática del espermatozoide. El espermatozoide se convierte en capacitado cuando su grado de desestabilización llega a cierto umbral. Este nivel de desestabilización lo pone en condiciones de sufrir la reacción acrosómica en presencia de la zona pelúcida. Simultáneamente, adquiere motilidad hiperactiva. Como la desestabilización es un proceso continuo, las funciones de la membrana degeneran y el espermatozoide pierde la capacidad de mantener bajas concentraciones de  $[Ca^{2+}]_i$

libre. La célula sufre la reacción acrosómica espontánea en respuesta a este aumento del  $[Ca^{2+}]_i$ , y la capacidad de moverse declina. Así, el grado de desestabilización que permite la reacción acrosómica espontánea sería considerado el límite para una “ventana” de desestabilización dentro de la cual el espermatozoide está en un estado “capacitado”. Si la desestabilización continúa por encima de ese umbral, la célula muere. Sólo aquellos espermatozoides que durante este proceso de desestabilización encuentren el oocito son capaces de penetrar exitosamente la zona pelúcida.

### **1.1.3. La hiperactivación**

El movimiento hiperactivo fue descrito por primera vez por Yanaginachi (1969, 1970) en el espermatozoide de hamster. La hiperactivación es un tipo de movilidad que tienen los espermatozoides y que se caracteriza por estar asociada con un incremento en la velocidad, un descenso en la linealidad, un incremento en la amplitud del movimiento de la cabeza, y un aumento de la velocidad de batido del flagelo (Yanagimachi, 1994; Kinukawa y col., 2003). Este patrón de movimiento estaría relacionado con los estadios finales de la capacitación (Katz y col., 1989). Esta hiperactivación ha sido identificada en al menos 15 especies diferentes de mamíferos (Kay y Robertson, 1998).

Si bien en una primera etapa se definieron diversos patrones para describir el movimiento hiperactivo (Yanagimachi, 1970; Katz y col., 1978, 1989; Drobnis y col., 1988a,b), trabajos recientes sugieren que los patrones de movimiento hiperactivo varían entre especies, y que estas diferencias serían consecuencia de diferencias interespecíficas en la estructura del flagelo (Yanagimachi, 1994; Suarez, 1996).

Parecería ser que la hiperactivación es importante para permitir a los espermatozoides salir de un reservorio del istmo en el ratón (Demott y Suarez, 1992) y para prevenir la adhesión de los espermatozoides al epitelio oviductal en el hamster (Smith y Yanagimachi, 1991). Los estudios *in vitro* en humanos sugieren que la hiperactivación podría ser requerida para despegar los espermatozoides del epitelio uterino (Pacey y col., 1995; Gualtieri y col., 2005).

La movilidad hiperactiva le permitiría a los espermatozoides cumplir además determinadas funciones fisiológicas (Katz y col., 1989). Evidencias experimentales obtenidas del estudio de poblaciones de espermatozoides de ratón muestran que la hiperactivación confiere una ventaja mecánica directa a los espermatozoides, permitiéndoles la penetración a través de medios viscosos (Suarez y col., 1991), lo que

podría facilitar el pasaje a través del oviducto y las envolturas del oocito. También se ha propuesto que la hiperactivación podría mejorar la migración de los espermatozoides a través de los pliegues epiteliales del oviducto previniendo que sean "atrapados" en estos y aumentando de este modo, la probabilidad de contacto con el cumulus (Suarez, 1987; Katz y col., 1989). En el hamster y el cobayo, el desarrollo de hiperactivación podría ser importante promoviendo la penetración de la zona pelúcida (Katz y Yanagimachi, 1980; Katz y col., 1989; Stauss y col., 1995), aunque no ha mostrado ser necesaria para la fusión del espermatozoide y el oocito (Flemming y Yanagimachi, 1982).

Los mecanismos que controlan la hiperactivación *in vivo* están poco entendidos. Hay evidencias de que varios componentes del tracto genital femenino pueden actuar como estímulo para inducir hiperactivación (Kulin y col., 1994; Ho y Suarez, 2001).

Para lograr inducir hiperactivación *in vitro*, se requiere de condiciones específicas de incubación de los espermatozoides. Así, se comprobó que el calcio es necesario para el comienzo de la hiperactivación (Fraser, 1977; Suarez y col., 1983; Olds-Clarke y Seago, 1992; Ahmad y col., 1995; Ho y col., 2002; Quill y col., 2003; Suarez y Ho, 2003; Marquez y Suarez, 2004; Igotz y Suarez, 2005). Otros factores que afectan la hiperactivación *in vitro* incluyen el potasio, el sodio (Fraser, 1983), el bicarbonato (Neill y Olds-Clarke, 1987; Luconi y col., 2005), la albúmina (Yanagimachi, 1970), el peróxido de hidrógeno (Griveau y col., 1994) la progesterona (Sueldo y col., 1993; Oehninger y col., 1994; Munire y col., 2004) y la glucosa (Vandevoort y Overstreet, 1995).

Las bases bioquímicas de la hiperactivación no están completamente comprendidas. Yanagimachi (1994) propuso un mecanismo en el que estarían involucrados la pérdida o alteración de elementos de superficie de la cola del espermatozoide. Mortimer (1997) realizó una reseña de los requerimientos bioquímicos para producir hiperactivación en espermatozoides de distintas especies de mamíferos y varios autores (Ho y Suarez, 2001,2003; Bajpai y col., 2003; Igotz y Suarez, 2005; Luconi y col., 2005) reseñaron la función y regulación de la misma.

#### 1.1.4. La reacción acrosómica

Los oocitos de todos los euterios están rodeados por una capa de glicoproteínas llamada zona pelúcida. Al momento de la ovulación ésta se encuentra rodeada por el cumulus oophorus, que son células de la granulosa y una matriz compuesta mayoritariamente por ácido hialurónico polimerizado (Yanagimachi, 1994).

Durante la capacitación, el espermatozoide adquiere la habilidad para penetrar el cumulus oophorus y unirse a la zona pelúcida que rodea al oocito. Esta unión desencadena la reacción acrosómica. Durante la reacción acrosómica, la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática se fusionan, se desarrollan múltiples fenestraciones entre ambas membranas y la mayor parte del contenido enzimático del acrosoma se libera o descarga. La membrana acrosomal interna y el segmento ecuatorial persisten hasta la fusión del espermatozoide con el oocito en la mayoría de las especies. Cuando ocurre la reacción acrosómica, la membrana acrosómica interna es expuesta y se transforma en continua con la membrana plasmática (Yanagimachi, 1994).

En casi todos los mamíferos, los espermatozoides fecundantes, *in vivo*, sufren reacción acrosómica (RA) en la superficie de la zona pelúcida, justo antes de penetrarla. No obstante, *in vitro*, los espermatozoides de la mayoría de los mamíferos pueden sufrir RA en ausencia de zona pelúcida. La RA en espermatozoides móviles activos en un medio capacitante, sin agentes estimulantes, se llama comúnmente reacción acrosómica espontánea. Este tipo de RA no es fisiológica. Los espermatozoides que sufrieron la reacción acrosómica espontánea no son fecundantes (Yanagimachi, 1994).

La glicoproteína ZP3 (de la zona pelúcida de mamíferos) es el inductor fisiológico de la RA *in vivo* en el ratón (Leyton y Saling, 1989b; Wassarman, 1991). Esta ZP3, que contiene el receptor para el espermatozoide, ha sido extensivamente estudiada y muestra una considerable homología entre especies (Koothan y col., 1993). Otros estímulos potenciales para la RA *in vivo* e *in vitro* incluirían los fluidos oviductales y foliculares, así como determinadas proteínas de la matriz del cumulus oophorus (Reyes y col., 1984; Meizel, 1985; Siiteri y col., 1988; Leyton y Saling, 1989b; Mortimer y Camenzind, 1989; Morales y col., 1992; De Jonge y col., 1993; Saragüeta y col., 1994; Morales y Llanos, 1995; Fabbri y col., 1998; Marin-Briggiler y col., 2003; Munuce y col., 2003; Burrello y col., 2004).

Por otra parte, altas concentraciones de progesterona y otros esteroides presentes en el cumulus oophorus inducen la RA, como se ha demostrado en espermatozoides de ratón

y cerdo *in vitro* (Melendrez y col., 1993,1994; Roldan y col., 1994; Kholkute y col., 1995; Wu y col., 2006), en equinos (Meyers y col., 1995; Cheng y col., 1998; Rathi y col., 2003), hamster (Llanos y col., 1993; Llanos y Anabalon, 1996), cobayo (Jia y col., 1997; Chen y col., 2000), caprinos (Somanath y col., 2000), bovinos (Therien y Manjunath, 2003) y en humanos (Osman y col., 1989; Thomas y Meizel, 1989; Blackmore y col., 1990; Meizel y col., 1990; Sueldo y col., 1993; Kuroda y col., 1999). El ionóforo de calcio A23187 ha sido ampliamente utilizado para inducir RA en espermatozoides humanos capacitados *in vitro* (Byrd y Wolf ,1986; Liu y Baker, 1988; Zhang y col., 1991; Pampiglione y col., 1993). Con este fin, también ha sido utilizada la lisofosfatidilcolina (LPC) en espermatozoides de cobayo, toro, búfalo y humanos (Yanagimachi y Suzuki, 1985; Parrish y col., 1988; Zini y col., 1995; Shit y Atreja, 2004).

Moléculas como el ATP (Tomiyama y col., 1995), inhibidores de fosfodiesterasas como la cafeína o la pentoxifilina (Tasdemir y col., 1993; Tesarik y Mendoza, 1995; Ain y col., 1999), el factor de activación plaquetaria (PAF, 1-o-alkil-2-acetil-sn-glicerol-3-fosfocolina; Krausz y col., 1994; Aravindakshan y Sharma, 1996; Odeh y col., 2003); el factor de crecimiento epidérmico (Lax y col., 1994), ácido gamma-amino butírico (GABA) (Cao y col., 1997; Shi y col., 1997), el análogo no hidrolizable del GTP denominado GTP $\gamma$ S (Dominguez y col., 1996), el péptido natriurético auricular (ANP) (Zamir y col., 1995; Rotem y col., 1998; Zhang y col., 2005), la heparina (Christensen y col., 1996), la angiotensina II (Gur y col., 1998; Mueller y col., 1998), la fibronectina y la laminina (Mattioli y col., 1998), glicosaminoglicanos (Handrow y col., 1982) y neoglicoproteínas (NGPs) (Brandelli y col.,1994,1995; Brandelli, 1997; Loeser y Tulsani, 1999), estimulan también la RA *in vitro*.

Actualmente se acepta la presencia de receptores específicos para ZP3 en la superficie del espermatozoide. Cuando el espermatozoide está capacitado, la fluidez de la membrana plasmática aumenta por la pérdida de colesterol y la remoción de factores descapacitantes, lo que permitiría a estos receptores moverse libremente en la membrana. Baldi y col. (1996) propusieron que estos receptores serían quinasas. El receptor activado por ZP3 estimularía a una proteína G (Kopf y Gerton, 1991; Hinsch y col., 2005), que activaría una serie de fosfolipasas en la membrana plasmática (Lax y col., 1990; Dominguez y col., 1996) y se desarrollaría una casacada de eventos que llevan a la producción de compuestos altamente fusogénicos y el aumento del Ca<sup>2+</sup>

intracelular (Dominguez y col., 1999). Dentro de estos eventos se incluyen la activación de la fosfolipasa C (Roldan y Harrison, 1989), la activación de la fosfolipasa A<sub>2</sub> (Roldan y Fragio, 1993), la activación de la proteinquinasa C (Breitbart y col., 1992; Patrat y col., 2000), la proteinquinasa A (Kuji y col., 2005), y la activación de enzimas involucradas en el metabolismo del AMPc (De Jonge y col., 1991). Distintos autores (Baldi y col., 1996; Breitbart y Spungin, 1997; Naor y Breitbart, 1997; Florman y col., 1998; Park y col., 2003) involucraron en el aumento intracelular de Ca<sup>2+</sup> a canales iónicos dependientes de voltaje ubicados en la membrana acrosomal externa, los que liberarían Ca<sup>2+</sup> hacia el citoplasma, produciendo un débil aumento de la concentración interna de Ca<sup>2+</sup>. Simultáneamente, actuaría otro mecanismo que llevaría a un aumento del pH intracelular. Adicionalmente, sería necesaria la polimerización de actina durante la reacción acrosómica en las regiones ecuatorial y postacrosomal del espermatozoide (al menos en el cobayo) y que en esta polimerización estarían involucradas GTPasas (Delgado-Buenrostro y col., 2005).

Como señalara anteriormente, la progesterona puede inducir la RA de espermatozoides humanos muy eficientemente, pero el mecanismo de acción no es aún muy claro (Baldi y col. 1995). A pesar de ello, estudios realizados por Aitken y col. (1998), mostraron la importancia del ion HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> y de un medio intracelular alcalino para la acción de la progesterona en espermatozoides humanos. La progesterona induciría RA por unión a y agregación de receptores específicos en la membrana plasmática y causaría la entrada de Ca<sup>2+</sup> y salida de Cl<sup>-</sup> (Thomas y Meizel, 1989; Meizel y Turner, 1996) En este sentido, Meizel (1997, 1998) propuso dos mecanismos distintos para la RA según sea inducida por progesterona o por zona pelúcida. En el caso de la inducción por progesterona estarían involucrados canales de Cl<sup>-</sup> del tipo receptor de GABA<sub>A</sub> (Murase y Roldan, 1996), mientras que la inducción por zona pelúcida requeriría la participación de canales de Cl<sup>-</sup> del tipo receptor de glicina (Melendrez y Meizel, 1995, 1996; Bray y col., 2002; Meizel y Son, 2005). La activación de ambos receptores resultaría en una despolarización de la membrana plasmática y un control de canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje.

De todos modos, el mecanismo por el cual se desarrolla la reacción acrosómica no ha sido completamente establecido, y una serie de modelos se han postulado, cada uno de ellos explicando parcialmente la cascada de eventos que se desarrollan durante la RA



(Yanagimachi, 1994; Brucker y Lipford, 1995; Mate y Rodger, 1996; Aitken, 1997a; Breitbart y Spungin, 1997; Meizel, 1998; Tulsani y col., 1998; Belmonte y col., 2005).

## **1.2. EL ACIDO GAMA-AMINO BUTIRICO (GABA)**

### **1.2.1. Biosíntesis y metabolismo**

El ácido gama-aminobutírico (GABA) es el neurotransmisor aminoácido más conocido y posee un rol inhibitorio en el Sistema Nervioso Central (SNC) (Roberts, 1976). Si bien su presencia en el cerebro fue identificada hacia 1950 (Awapara y col., 1950; Roberts y Frankel, 1950), su función como inhibidor fue establecida algunos años después (Hayashi y Nagai, 1956; Kuffler y Edwards, 1958). Sin embargo, el GABA no se encuentra confinado al SNC, sino que también ha sido identificado en el Sistema Nervioso Periférico (SNP), en tejidos endócrinos y en algunos tejidos no neuronales, donde podría desempeñar diversas funciones (Tanaka, 1985; Erdö y Kiss, 1986; Erdö y Wolff, 1990; Gladkevich y col., 2006).

El GABA puede ser producido a partir de la glucosa, a pesar de que el piruvato y otros aminoácidos pueden servir como precursores (De Robertis, 1986). Es por ello que su metabolismo está íntimamente relacionado al del glutamato o ácido glutámico y los ciclos de la glutamina (Purves y col., 1997; Nestler y col., 2001; Patel y col., 2005).

El GABA se origina también en el denominado ciclo del 4-aminobutirato, que representa un desvío de la descarboxilación oxidativa del 2-oxoglutarato (también llamado  $\alpha$ -oxoglutarato) en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos o de Krebs (Yogeeswari y col., 2005). Aquí, un intermediario, el  $\alpha$ -oxoglutarato, es transaminado a glutamato y éste es descarboxilado por la enzima glutamato descarboxilasa (GAD) para producir GABA (Watanabe y col., 2002; Patel y col., 2006) (Figura 3). Este camino fue demostrado en el cerebro (Wu, 1976), cerebelo (Sonnewald y col., 2006), en varios microorganismos (*Clostridium welchii*, *Escherichia coli*), plantas superiores (espinaca, cebada) y otros tejidos animales (hígado, músculo) (Scott y Eagleson, 1988).

El glutamato (precursor del GABA) también puede ser sintetizado a partir de la glutamina por la enzima glutaminasa. Este camino de síntesis es el que prevalece en neuronas glutamatergicas excitatorias (Purves y col., 1997).

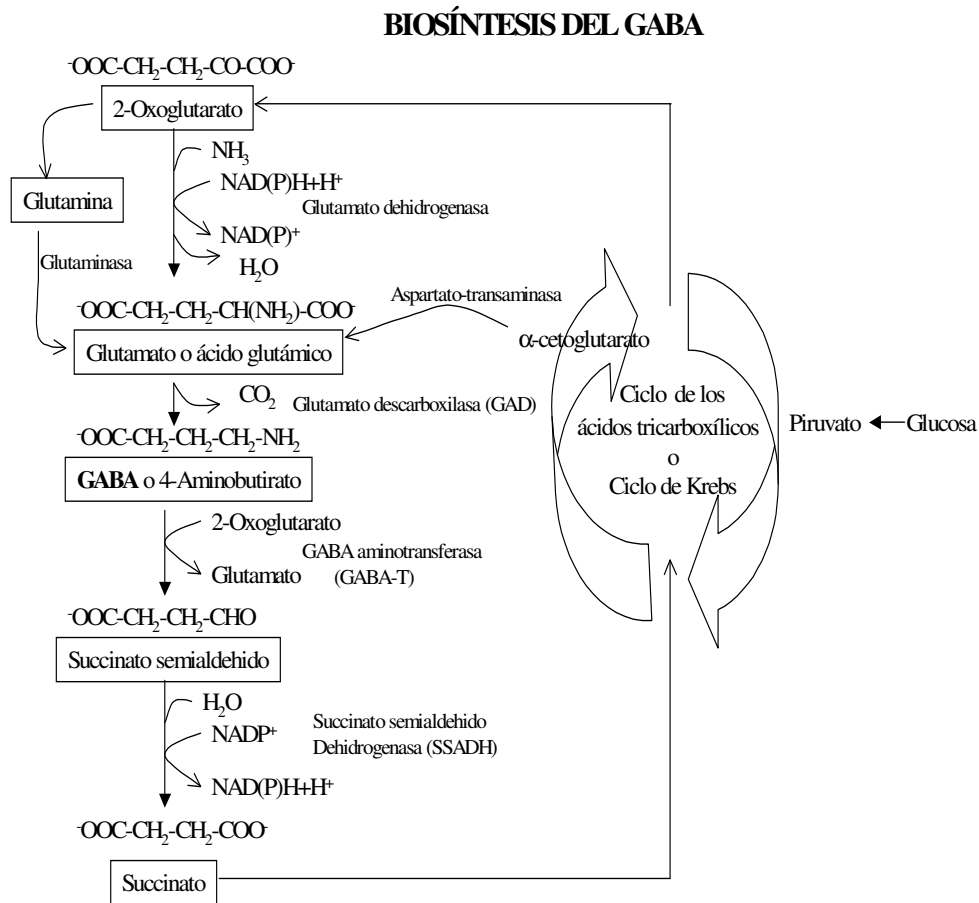


Figura 3. Biosíntesis y degradación del GABA.

En el caso del cerebro, sólo algunas células de éste producen GABA, y sólo un 25% del 2-oxoglutarato producido en estas células es convertido a GABA. El camino de producción del GABA por el ciclo del 4-aminobutirato representa menos del 10% del metabolismo oxidativo total del cerebro. El GABA también puede ser formado a partir del ácido 4-guanidobutírico en Basidiomycetes y a partir de la urea en Streptomycetes (Scott y Eagleson, 1988).

En el caso particular del útero y oviducto de rata se ha demostrado la síntesis de GABA a partir de putrescina (Erdö, 1986). En la glándula adrenal y mucosa intestinal de la rata, la diamino oxidasa (DAO) transamina putrescina para producir GABA (Caron y col., 1988; Fogel y Erdö, 1992).

La mayoría del GABA, especialmente en el SNC, existe en formas unidas como homocarnosina y una variedad de enzimas están involucradas en el metabolismo de unión del GABA (Jakobs y col., 1993).

La Figura 4 representa otras rutas alternativas para la síntesis de GABA (Tillakaratne y col., 1995):

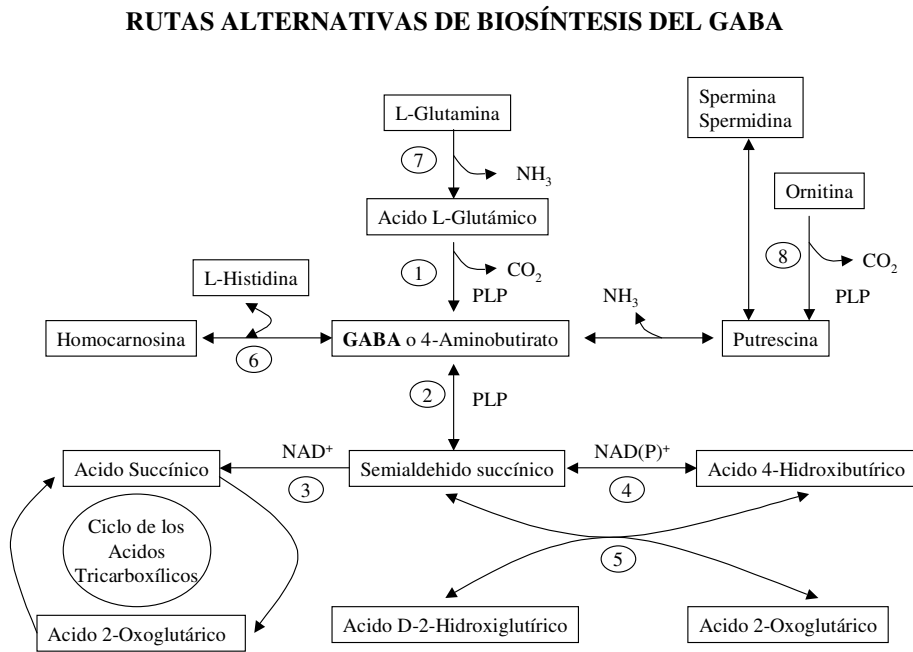


Figura 4. Rutas alternativas para la síntesis de GABA. Donde: PLP = piridoxal-5-fosfato, NAD = nicotinamida adenina dinucleótido, NAD(P)+ = nicotinamida adenina dinucleótido (fosfato), CO<sub>2</sub> = dióxido de carbono, NH<sub>3</sub> = amonio, 1-Acido glutámico descarboxilasa, 2-GABAaminotransaminasa, 3-semialdehído succínico deshidrogenasa, 4- 4 hidroxibutirato deshidrogenasa, 5-D-2-hidroxi-glutarato transhidrogenasa, 6-carnosinasa, 7-glutaminasa, 8-ornitinas descarboxilasa.

Para su degradación, el GABA es transaminado por la enzima GABAaminotransferasa o GABAtransaminasa (GABA-T) a semialdehído succínico (SSA), que es rápidamente oxidado a ácido succínico por la semialdehído succínico deshidrogenasa (SSADH) y reingresa en el ciclo de Krebs. En la transaminación del GABA a SSA, el  $\alpha$ -oxoglutarato actúa como aceptor del grupo amino produciendo glutamato, cerrando el ciclo del GABA y manteniendo la suplementación de este precursor del GABA (Scott y Eagleson, 1988).

### **1.2.2 Acciones del GABA en el Sistema Nervioso Central y en tejidos no neurales**

El GABA tiene múltiples funciones en el SNC y en el SNP (Tillakaratne y col., 1995; Cardinali y Golombek, 1998; Myshunina, 2003). Un acúmulo de evidencias sugieren que el GABA está involucrado en otros procesos además de la neurotransmisión en el SNC, SNP, tejidos endócrinos y otros tejidos no neurales (Erdö y Kiss, 1986; Erdö y Wolff, 1990; Erdö, 1992). Así, por ejemplo, el GABA deprime los potenciales de acción ganglionares e inhibe la liberación de acetilcolina inducida por estimulación, y tiene un efecto trófico en las neuronas de los Ganglios Cervicales Superiores (GCS) (Brown y Higgins, 1979).

Además, el GABA induce cambios ultraestructurales sobre dendritas de células de ganglios principales (Wolff y col., 1978). También la aplicación por períodos largos de GABA promueve la capacidad sinaptogénica de las neuronas de los GCS de ratas por medio de receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub> (Wolff y col., 1987; Parducz y col., 1990).

Algunos de los papeles alternativos del GABA propuestos en tejidos no neurales están basados en la presencia de GABA, su receptor y enzimas metabólicas (GAD, GABA-T y SSADH), o en la respuesta farmacológica producida en tejidos aislados y órganos.

Así, si bien se ha encontrado GABA en tejido hepático, su metabolismo allí no está completamente comprendido (Erdö y Kiss, 1986). Se sabe que la captación de GABA y su metabolismo inicial ocurre en hepatocitos pero no en células endoteliales ni en células de Kupffer (Mínuk y col., 1984). Ferenci y col. (1983) propusieron que sería la GABA-T hepática la responsable de regular los niveles de GABA presentes en el suero. Otros estudios demostraron que la mayor actividad GABA-T fuera del SNC se encuentra en el hígado (White y Sato, 1978).

También ha sido identificada la presencia de GABA en el riñón de mamíferos (Goodyer y col., 1982; Dobo y col., 1992), pero su función tampoco está claramente entendida. A pesar de ello, se piensa que el GABA renal estaría involucrado en el proceso de amoniagénesis (Lancaster y col., 1973; Goodyear y col., 1980). También se ha sugerido que tendría una función en la regulación de la permeabilidad del nefrón al cloro (Tillakaratne y col., 1995).

Erdö y Kiss (1986) demostraron que el GABA está presente también en el bazo de ratón, rata y conejo; y que hay actividad GABA-T en el corazón de ratón, pero en todos los casos se desconoce su función en estos tejidos.

Tanto el GABA como su receptor y las enzimas responsables de su metabolismo fueron encontradas en el páncreas de mamíferos en concentraciones altas (Okada y col., 1976; Taniguchi y col., 1979; Vincent y col., 1983; Gilon y col., 1991; Sorenson y col., 1991; Borboni y col., 1994). El GABA está presente en las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans (Rorsman y col., 1989; Sorenson y col., 1991), mientras que receptores GABA<sub>A</sub> se han encontrado en las células  $\alpha$  (Rorsman y col., 1989). Gaskins y col. (1995) demostraron que las células  $\beta$  de los islotes que secretan insulina pueden liberar GABA en respuesta a niveles elevados de glucosa. Sin embargo, la función del GABA en el páncreas es objeto de múltiples controversias (Taniguchi y col., 1982; Satin y Kinard, 1998; Fernandez-Pascual y col., 2004).

En la rata, la mayor parte del GABA presente en la glándula adrenal jugaría un papel en la modulación de la liberación de catecolaminas desde la médula adrenal (Kataoka y col., 1984; Oset-Gasque y col., 1992) y el encontrado en los elementos neuronales de ganglios simpáticos (Happola y col., 1992; Wolff y col., 1992) actuaría como un modulador inhibitorio de la transmisión ganglionar (Wolff y col., 1987; Park y col., 2006).

La existencia de sistemas GABA neurales y no neurales en el tracto gastrointestinal está ampliamente documentada y su función estaría relacionada con la motilidad intestinal y con secreciones endócrinas (Gilon y Ramacle, 1992; Kerr y Ong, 1992; Tanaka y Taniyama, 1992; Krantis, 2000; Tsai y col., 2005).

El GABA podría también regular el tono de los vasos sanguíneos cerebrales (Roberts y Krause, 1982; Tillakaratne y col., 1995).

El papel del GABA en la regulación de las secreciones endócrinas también recibió una atención considerable. Así, el GABA incrementa la liberación de LH *in vivo* e *in vitro*

(Vijayan y McCann, 1978; Virmani y Stojilbovic, 1989; Ferreira y col., 1996) y estimula la liberación de LHRH de fragmentos hipotalámicos *in vitro* (Masotto y Negro-Vilar, 1986). También el GABA ha sido involucrado en el control de las funciones hipofisiarias (Gamel-Didelon y col., 2002,2003; Catalano y col., 2005) y es discutido su papel en el control del comportamiento reproductivo (Lieb y col., 1994; Hernandez-Tristan y col., 2006).

Además, el GABA también estaría involucrado en la regulación de las contracciones uterinas durante el parto (Fujii y Mellon, 2001).

Recientemente, ha sido propuesto un papel para el GABA en el desarrollo neuronal temprano (Jelitai y col., 2004; Jelitai y Madarasz, 2005).

En síntesis, se puede decir que el papel del GABA, y de las enzimas responsables del metabolismo del mismo en tejidos no neurales está en pleno estudio. Debido a que el GABA puede ser convertido en ácido succínico y sufrir un metabolismo oxidativo por el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, se puede especular que el GABA podría servir como una fuente alternativa de energía, además de ser un importante neuromodulador. También se ha propuesto que en tejidos no neurales, el GABA podría tener un papel regulatorio en conjunto con hormonas esteroideas y catecolaminas (Tillakaratne y col., 1995).

### **1.3. RECEPTORES DE GABA**

#### **1.3.1. Generalidades**

Las membranas celulares permiten el paso por simple difusión del agua y de las moléculas no polares. Sin embargo, las membranas celulares también son permeables a diversas moléculas polares tales como iones, azúcares, aminoácidos, nucleótidos y muchos metabolitos celulares. La transferencia de estos solutos a través de las membranas celulares es responsabilidad de unas proteínas de membrana especiales, llamadas proteínas de transporte a través de las membranas. Cada proteína está destinada al transporte de un tipo de molécula.

Existen dos clases mayoritarias de proteínas de transporte de membrana: a) las proteínas transportadoras, también llamadas transportadores o carriers y b) las proteínas de canal.

Las proteínas de transporte unen el soluto específico que va a ser transportado y sufren un cambio conformacional que permite la transferencia del soluto a través de la membrana.

Las proteínas de canal forman poros llenos de agua que atraviesan la bicapa lipídica. Cuando estos poros están abiertos, permiten que determinados solutos puedan pasar a través de ellos y por lo tanto atravesar la membrana.

Las proteínas de canal de la membrana plasmática de las células animales y vegetales forman pequeños poros altamente selectivos. Casi todas estas proteínas de canal están relacionadas específicamente con el transporte iónico, por lo que se las denomina canales iónicos.

Los canales iónicos no están acoplados a una fuente energética, de forma que el transporte que median siempre es pasivo, permitiendo que iones específicos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Cl}^-$ ) puedan difundir siguiendo su gradiente electroquímico a través de la bicapa lipídica.

Una característica de los canales iónicos es que no están continuamente abiertos. La apertura de ellos responde a perturbaciones específicas de la membrana. Los principales tipos de perturbaciones que causan la apertura de los canales iónicos son: a) cambios en el voltaje a través de la membrana (canales regulados por voltaje), b) estimulaciones mecánicas (canales regulados mecánicamente) y c) la unión de una molécula señal (canales regulados por ligando). Dentro de estos últimos, el ligando señal puede ser un mediador extracelular llamado neurotransmisor (canales regulados por transmisor) o un mediador intracelular. El mediador intracelular puede ser un ion (canales regulados por ion), un nucleótido (canales regulados por nucleótido) o una proteína reguladora de unión a GTP (canales regulados por proteína G) (Alberts y col., 1992).

Los neurotransmisores de acción rápida incluyen la acetilcolina, el GABA, la glicina, el glutamato y el aspartato. En general, una neurona en concreto secreta uno sólo (y ocasionalmente dos) de estos transmisores (Mayer y Westbrook, 1987; Gottlieb, 1988).

Los neurotransmisores se pueden clasificar según sus acciones. La acetilcolina, el glutamato y el aspartato, al actuar sobre su receptor presente en la membrana de la fibra muscular esquelética provocan la despolarización de la fibra, desencadenando un potencial de acción. Por lo tanto, este receptor de transmisor media un efecto excitador.

Como contrapartida, el GABA y la glicina median una inhibición rápida. Los receptores a los que se unen están asociados a canales que, en estado abierto, permiten el paso de pequeños iones negativos (principalmente el  $\text{Cl}^-$ ) pero que son impermeables a los iones positivos (Baker y Owen, 1986; Yang y Olsen, 1987). La apertura de estos canales de  $\text{Cl}^-$  tiende a mantener el potencial de membrana en su valor de reposo o incluso en un valor hiperpolarizado, haciendo más difícil despolarizar la membrana y por lo tanto, excitar a la célula; pero en algunas neuronas, los iones  $\text{Cl}^-$  salen, produciendo una despolarización (Johnston, 1996). De aquí que, como ya se ha manifestado, el GABA y la glicina son los principales transmisores que median la inhibición rápida en el SNC de los vertebrados. Por otra parte, se sabe que el GABA realiza esta misma función en las uniones neuromusculares de los insectos y los crustáceos (Mayer y Westbrook, 1987; Gottlieb, 1988).

Se conocen agonistas y antagonistas que reaccionan de forma diferente con los receptores de los distintos neurotransmisores, de manera que es corriente caracterizar a los diferentes receptores gracias a los agonistas y antagonistas que se unen a ellos (Snyder, 1984).

Los receptores GABA son parte de una superfamilia de canales iónicos activados por ligando que incluyen a los receptores de acetilcolina nicotínicos y receptores de glicina sensibles a estrocnina, además de los receptores de glutamato ionotrópicos y receptores de serotonina (Schofield y col, 1987; Ortells y Lunt, 1995; Chebib y Johnston, 1999).

### **1.3.2. Diferentes tipos de receptores de GABA**

La clasificación de los receptores de GABA fue establecida en 1981, definiéndose como receptor  $\text{GABA}_A$  a aquel que era sensible al antagonismo por bicuculina e insensible al baclofen, mientras que el receptor  $\text{GABA}_B$  era aquel insensible al antagonismo por bicuculina y activado por el baclofen (Hill y Bowery, 1981). Los receptores  $\text{GABA}_A$  y  $\text{GABA}_B$  difieren no sólo en su farmacología, sino también en su funcionamiento.

Los receptores  $\text{GABA}_A$  controlan la apertura de canales iónicos de cloro (Bormann, 1988; Silviotti y Nistri, 1991) mientras que los receptores  $\text{GABA}_B$  están unidos a un sistema de segundo mensajero (Enz y Cutting, 1998). Tanto los receptores  $\text{GABA}_A$  como los receptores  $\text{GABA}_B$  se localizan en regiones pre y postsinápticas de neuronas. Además, ambos subtipos son heterogéneos (Whiting, 1999; Vacher y Bettler, 2003).



Por otra parte, hay ahora una considerable evidencia de que el GABA puede activar receptores que no se encuadran en la clasificación de 1981, ya que estos receptores son relativamente insensibles a los efectos del baclofen, barbituratos, benzodiazepinas y la bicuculina (Feigenspan y col., 1993; Qian y Dowling, 1993; Wisden y col., 1996). Estos "nuevos" receptores de GABA fueron descritos en retina de vertebrados, cerebelo, hipocampo, tectum óptico, médula espinal y también en insectos (Rozzo y col., 2002; Kirischuk y col., 2003; Lukasiewicz y col., 2004). Estos "nuevos" receptores fueron llamados en un primer momento receptores GABA<sub>C</sub>, receptores GABA<sub>NANB</sub> ("no-A, no-B") y también receptores GABA<sub>p</sub>. Actualmente han sido colectivamente denominados receptores GABA<sub>C</sub> (Johnston, 1994; Borman y Feigenspan, 1995), aunque recientemente ha sido sugerido denominarlos receptores GABAA0r (Bormann, 2000). Estos receptores GABA<sub>C</sub> están directamente asociados con canales iónicos de cloro y podrían ser homooligómeros de un tipo particular de subunidad ( $\rho$ ) o bien heterooligómeros de varios tipos de subunidades (Enz y Cutting, 1998; Boue-Grabot y col., 2000; Pan y col., 2000; Harrison y Lummis, 2006). De esta manera, habría una gran diversidad de receptores GABA<sub>C</sub> y tendrían propiedades funcionales diferentes (Qian y col., 1998; Johnston y col., 2003; Kirischuk y col., 2003).

## **1.4. RECEPTORES GABA<sub>A</sub>**

### **1.4.1. Estructura**

Los receptores GABA<sub>A</sub> parecen ser los más complejos de la superfamilia de los canales iónicos activados por ligando en términos del gran número de subtipos de receptores y también de la variedad de ligandos que interactúan con sitios específicos en los receptores (Kerr y Ong, 1992).

El estudio de las propiedades farmacológicas del GABA permitió la construcción de una macromolécula esquematizada para el receptor GABA<sub>A</sub> (Figura 5) (Olsen, 1981; Robel y Baulieu, 1994; Kardos, 1999).

El receptor purificado está formado por 2 polipéptidos mayores ( $\alpha$  de 51 kDa y  $\beta$  de 56 kDa). Originalmente, se propuso como estructura para el receptor la de un complejo hetero-oligomérico de 220-300 kDa (Sigel y col., 1983). Basados en la similitud de las

secuencias, han sido identificadas 5 familias de subunidades del receptor GABA<sub>A</sub> y fueron nombradas como subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , y  $\rho$  (Mihic y col., 1995). Hay entre un 30 y 40% de secuencias homólogas entre las familias de subunidades.

Recientemente fueron identificadas tres nuevas subunidades correspondientes al receptor GABA<sub>A</sub>, denominadas subunidad  $\pi$ ,  $\epsilon$  y  $\theta$ .

Todo esto nos habla de la gran variedad de combinaciones posibles de subtipos de subunidades, lo que origina una variedad muy grande de receptores GABA<sub>A</sub> que difieren sólo en las isoformas de las subunidades que los constituyen. A pesar de esto, la combinación pentamérica estequiométricamente más favorecida incluye 2 subunidades  $\alpha$ , 2 subunidades  $\gamma$  y 1 subunidad  $\beta$  (Backus y col., 1993) o bien 2 subunidades  $\alpha$ , 2 subunidades  $\beta$  y 1 subunidad  $\gamma$  (Chang y col., 1996).

Las combinaciones diferentes de los subtipos de subunidades proteicas hacen que la farmacología y fisiología de los distintos tipos de receptores GABA<sub>A</sub> no sean necesariamente iguales (MacDonald y Angelotti, 1993; Puia y col., 1993; Mellon, 1994; Mihic y col., 1995; Maitra y Reynolds, 1999; Smith y col., 2001).

#### **1.4.2. Funcionamiento**

El GABA media la neurotransmisión inhibitoria rápida por medio de la activación de receptores GABA<sub>A</sub>/canales de Cl<sup>-</sup>. Como ya se ha indicado, normalmente, los iones cloro ingresan a las neuronas, produciendo una hiperpolarización (Misgeld y col., 1986), pero en algunas neuronas, los iones cloro salen, produciendo una despolarización (Ben-Ari y col., 1989; Fizman y col., 1990; Michelson y Wong, 1991; Xie y Smart, 1991,1993; McIntire y col., 1993; Staley, 1994; Smith y col., 1995; Marty y Llano, 2005).

La mayoría de los canales receptores GABA<sub>A</sub> están abiertos en el pico de las corrientes postsinápticas inhibitorias, y los receptores subsinápticos están virtualmente saturados por el GABA liberado en la hendidura sináptica (Edwards y col., 1990). La desensibilización de los receptores GABA<sub>A</sub> es dependiente de voltaje (Yoon, 1994).

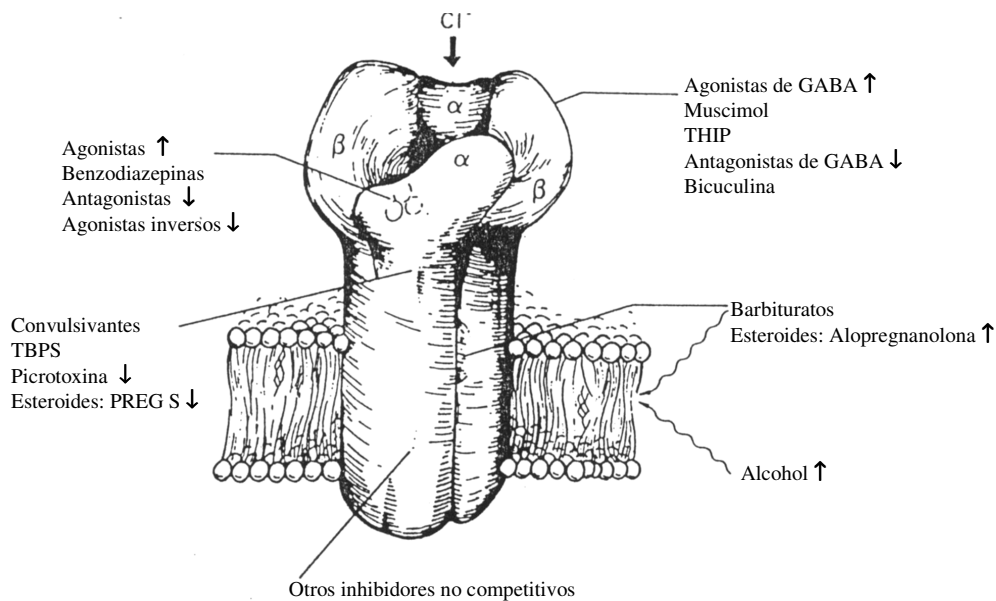


Figura 5. Modelo simplificado del receptor GABA<sub>A</sub>. Este esquema no representa el ensamble exacto de las subunidades ni la estequiometría de los sitios de reconocimiento del ligando asociados con las subunidades. Las líneas punteadas indican las categorías de los sitios sobre las subunidades mayores α y β. La subunidad γ (no representada) es necesaria para la unión de benzodiazepinas. Las líneas sinuosas indican una posible modificación de la estructura de la membrana. Las flechas verticales indican la estimulación o potenciación (↑) y la inhibición (↓) de la neurotransmisión GABAérgica por los ligandos listados.

GABA: ácido γ-aminobutírico; THIP: 4,5,6,7 tetrahidroisoxazolo[5,4-C]piridin-3-ol; TBPS: t-butilbiciclofosforotionato; PREG S: sulfato de pregnanolona (Modificado de Robel y Baulieu, 1994).

El GABA es reincorporado desde el ambiente sináptico por un proceso de transporte activo que recaptura el GABA y lo envía al interior de las terminales presinápticas para luego liberarlo, y al interior de células gliales vecinas en donde es metabolizado (Johnston y Balkar, 1989).

Recientemente, Sem`yanov (2005) propuso que las acciones del GABA no estarían limitadas sólo a la región postsináptica, sino que podría ser liberado en el espacio extrasináptico por recaptación del GABA, por exocitosis glial o por shock osmótico. Los receptores de GABA también estarían localizados en distintas partes de las neuronas y células gliales (Farrant y Nusser, 2005), y dependiendo de la distribución subcelular de estos receptores y su composición de subunidades, el efecto de este GABA extracelular sería diferente (Sem`yanov, 2005).

Adicionalmente se ha demostrado que el GABA incrementa el  $Ca^{2+}$  intracelular a través de su unión a un receptor  $GABA_A$  que a su vez activa canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje en distintos tipos celulares (Isaacson, 2001; Lyons y col., 2001; Ma y col., 2001; Pan 2001; Perrot-Sinal y col., 2001).

### **1.4.3. Propiedades farmacológicas**

Una serie de drogas modifican las corrientes que atraviesan el canal/receptor  $GABA_A$  (Olsen, 1987; Macdonald y Twyman, 1992). Los barbituratos y las benzodiazepinas aumentan las corrientes del canal/receptor  $GABA_A$  (Choi y col., 1977; Macdonald y Barker, 1978,1979) pero a través de diferentes sitios de regulación alostérica en el receptor (Olsen, 1981,1987; Study y Baker, 1981; Twyman y col., 1989). Los esteroides, incluyendo los esteroides anestésicos y los metabolitos de la progesterona, también aumentan las corrientes del canal/receptor  $GABA_A$  (Majewska y col., 1986; Callachan y col. 1987a,b). Drogas como la bicuculina, la picrotoxina, el metil6,7-dimetoxi-4-etil- $\beta$ -carbolina-3-carboxilato (DMCM), y la penicilina, reducen la inhibición mediada por GABA, pero cada una de estas drogas interactúa con un sitio diferente del canal/receptor  $GABA_A$ .

Para mejorar las corrientes en el canal/receptor  $GABA_A$ , una droga puede incrementar la conductancia del canal al aumentar la frecuencia de apertura y cierre y/o la duración de la apertura y cierre. Del mismo modo, para reducir las corrientes del canal/receptor  $GABA_A$ , las drogas pueden disminuir la conductancia del canal al disminuir la

frecuencia de apertura y cierre y/o la duración de la apertura y cierre del canal. De esta manera, el conocimiento de las alteraciones producidas en las corrientes del canal/receptor por el uso de distintas drogas y el mecanismo de acción de las mismas, nos permite un conocimiento más profundo de la estructura y funcionamiento del receptor. Es por ello que el conocimiento de las propiedades farmacológicas del receptor revisten un carácter fundamental en el estudio de los canales/receptores GABA<sub>A</sub>.

Podríamos resumir la compleja farmacología del receptor GABA<sub>A</sub> diciendo que existe una variedad de compuestos que interactúan con los receptores GABA<sub>A</sub>. El número de sitios diferentes para estos compuestos en el receptor GABA<sub>A</sub> está aún lejos de haber sido completamente dilucidado. Se sabe que, al menos, estos sitios incluyen:

- 1) Sitios para unión del GABA.
- 2) Sitios para reconocimiento de agonistas, que son también los sitios de acción de antagonistas competitivos.
- 3) Sitios para picrotoxina, que parece estar asociado al canal de cloro.
- 4) Sitios para barbituratos, que interactúan con los sitios de reconocimiento de agonistas y sitios para picrotoxinas.
- 5) Sitios para esteroides neuroactivos.
- 6) Sitios para benzodiazepinas.
- 7) Sitios para etanol.
- 8) Sitios esterosselectivos para anestésicos de inhalación.
- 9) Sitios para Zn<sup>2+</sup>.
- 10) Distintos sitios para cationes como Ca<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>.
- 11) Sitios intracelulares para el Ca<sup>2+</sup> asociados a la fosforilación de "rulos" intracelulares de las subunidades proteicas que constituyen el receptor GABA<sub>A</sub>.
- 12) Sitios para La<sup>3+</sup>.

Y que posiblemente también haya:

- 13) Sitios asociados con fosfolípidos que interactúan con subunidades proteicas del receptor.
- 14) Sitios asociados con actividad proteínquinasa involucrada en la fosforilación de subunidades proteicas.

## **1.5. RECEPTORES GABA<sub>B</sub>**

En 1981, Bowery y colaboradores descubrieron un nuevo tipo de receptor GABA que era insensible a la bicuculina y otros compuestos que interaccionan con los receptores GABA<sub>A</sub> clásicos, pero que era estereoselectivamente sensible al L-baclofen. A este tipo de receptores GABA se los llamó GABA<sub>B</sub>.

Los receptores GABA<sub>B</sub> están acoplados a canales de Ca<sup>2+</sup> y K<sup>+</sup> así como a otros sistemas de segundos mensajeros por medio de proteínas de unión del nucleótido guanina (proteínas G) (Bowery, 1989; New y col., 2006).

En 1987 se comprobó que el faclofen, que es el ácido fosfórico derivado del baclofen, bloqueaba selectivamente la acción del GABA y el baclofen sobre este tipo de receptores (Kerr y col., 1987). Este compuesto actúa como un agonista débil. Luego se descubrió el efecto como antagonista selectivo potente del ácido 3-aminopropil(dietoximetil)fosfínico (CGP35348) sobre los receptores GABA<sub>B</sub> (Olpe y col., 1990). Gracias a la existencia de estos compuestos, se determinó que estos receptores tienen distintos subtipos desde el punto de vista farmacológico.

Estudios electrofisiológicos apoyaron la existencia de heterogeneidad de receptores GABA<sub>B</sub> (Dutar y Nicoll, 1988; Calabresi y col., 1991; Dib y Ong, 1995). Por su parte, estudios bioquímicos demostraron la existencia de receptores GABA<sub>B</sub> con alta o baja afinidad por L-baclofen (Bonano y Raiteri, 1993).

La función más importante del receptor GABA<sub>B</sub> sería mediar la inhibición de la liberación de neurotransmisor a nivel presináptico (Bowery, 1989,1993; Bonano y Raiteri, 1993).

Recientemente, He y col. (2001) identificaron la presencia de receptores GABA<sub>B</sub> en testículo y espermatozoides de ratón.

## **1.6. PRESENCIA DE GABA Y DE LAS ENZIMAS DE SU METABOLISMO EN EL OVIDUCTO Y EL ÚTERO**

Se ha establecido que el oviducto de rata tiene las concentraciones más altas de GABA dentro de los órganos periféricos (Celotti y col., 1986). Su importancia es tal, que dichos niveles duplican las concentraciones encontradas en el cerebro (Martin del Río, 1981; Erdö y col., 1982). Estos valores fueron confirmados por distintos métodos de

evaluación (Apud y col., 1984, Fernandez-Pardal y col., 1984). En el oviducto de coneja (Erdö y col., 1984a) y de mujer (Erdö, 1983a), los niveles de GABA son un poco inferiores al 10% de los encontrados en el cerebro. También se detectaron concentraciones bajas de GABA en los oviductos de ratona, perra, gata, mona, cerda y oveja (Martín del Río, 1981). Estos hechos indicarían que los valores extremadamente altos de GABA encontrados en el oviducto de rata son una excepción entre las especies de mamíferos.

En cuanto al útero las concentraciones de GABA en rata y coneja fueron aproximadamente un 1% de la concentración de GABA cerebral (Martín del Río, 1981; Erdö, 1984a).

A continuación se presentan las concentraciones de GABA en los oviductos y el útero de varios mamíferos (Tabla IV):

Tabla IV. Concentraciones de GABA en el oviducto y útero de algunas especies de mamíferos.

TEJIDO	ESPECIE	CONCENTRACIÓN DE GABA (nmol/g de tejido)	REFERENCIA
Oviducto	Rata	5030	Martín del Río, 1981
		4438	Erdö y col., 1982
		4602	Apud y col., 1984
		2770	Fernandez-Pardal y col., 1984
	Conejo	110	Erdö, 1984a
	Humano	177	Erdö, 1983a
Utero	Rata	27	Martín del Río, 1981
		29.8	Erdö, 1984a
		520	Fernandez-Pardal y col., 1984
	Conejo	16.3	Erdö, 1984a

Existen variaciones fisiológicas de la concentración de GABA, las que están relacionadas con cambios cíclicos, cambios gestacionales, y cambios relacionados con la edad (Louzan y col., 1986; Forray y col., 1993).

Así, la concentración de GABA en el oviducto de rata mostró un valor máximo durante la fase diestro del ciclo ovárico (Martín del Río, 1981), cerca de un 30% más alto que durante los otros estadios del ciclo. Trabajos hechos por Erdö (1986), Louzan y col. (1986) y Forray y col. (1993) demostraron que la concentración de GABA en el oviducto de rata aumenta débilmente desde el principio del estro hasta el proestro temprano, donde alcanza un máximo, seguido por una aguda disminución en el proestro tardío y el estro temprano. En contraposición, Fernandez-Pardal y col. (1984), Gimeno y col. (1986) y Celotti y col. (1987) no encontraron cambios cíclicos en el contenido de GABA del oviducto de rata, a pesar de que sus resultados sugerían un aumento moderado durante el proestro.

En el útero de rata, también se determinó una variación cíclica de la concentración de GABA (Fernandez-Pardal y col., 1984; Gimeno y col., 1986). Sin embargo, la significancia estadística de la elevación de la concentración de GABA en el período de estro debe ser analizada con cuidado, debido al método utilizado para su evaluación (Martín del Río y col., 1986).

Respecto a los cambios gestacionales, se demostró un descenso progresivo de las concentraciones de GABA en el oviducto de ratas preñadas (Erdö, 1984b). Esta reducción significativa (cercana al 30% con respecto al control del diestro) de la concentración de GABA al día 21 de gestación indicaría la dependencia hormonal de los niveles de GABA en el oviducto de rata.

Al analizar los cambios relacionados con la edad, se observó que, en el oviducto de rata, la concentración de GABA muestra un aumento gradual durante las primeras 4 semanas posteriores al nacimiento. Luego permanece sin cambios hasta la décima semana después del nacimiento, para sufrir una disminución significativa a la edad de 12 y 24 meses (Forray y col., 1993). Estos resultados podrían indicar la maduración y también el envejecimiento del sistema gabaérgico del oviducto de la rata. Los valores altos de concentración de GABA obtenidos en animales en la edad de mayor fertilidad podría también estar relacionado con la función sexual.



Con respecto a la distribución del GABA en el oviducto y útero se determinó que en el ampulla oviductal de mujeres, la concentración de GABA toma un valor de 224 nmoles/g de tejido y de 181 nmoles/g de tejido en el istmo (Erdö, 1983a). Estas variaciones no fueron estadísticamente significativas. Adicionalmente, Erdö (1986) determinó en el oviducto de rata, concentraciones de 7,252 y de 3,117 nmoles/g de tejido en las regiones ampulares e ístmicas respectivamente.

Murashima y Kato (1984) demostraron en preparados de istmo oviductal de rata, que el GABA está presente entre 5 y 20 veces más concentrado en la capa mucosa que en las capas muscular y serosa, respectivamente.

Por otra parte, secciones de tejido del oviducto de rata incubadas con un antisuero antiGABA (Hodgson y col., 1985, Somogyi y col., 1985) mostraron una inmunorreactividad fuerte en el epitelio, particularmente en la superficie ciliada. A nivel de microscopía electrónica, esta inmunorreactividad específica se presentó en los cuerpos basales de las cilias. Sólo una tenue marcación se observó en otras estructuras como la capa muscular del oviducto (Erdö y col., 1986).

En homogenatos crudos de oviducto de rata se encontró actividad GAD (Martín del Río, 1981; Apud y col., 1984, Erdö y col., 1984a; Duvilanski y col., 1985). Esta actividad GAD tubárica es mucho menor que la del cerebro, pero sus propiedades bioquímicas y cinéticas son similares a la de la GAD cerebral (Erdö y col., 1984a). Además, estas dos enzimas son idénticas inmunológicamente hablando a pesar de su diferente origen (Apud y col., 1984; Celotti y col., 1986). Por otra parte, con el uso de inhibidores de la actividad GAD cerebral, se logró una inhibición de la actividad GAD tubárica e hipotalámica semejante (Erdö y col., 1984a), lo que indica la similitud de ambas enzimas.

También se encontró actividad GAD en homogenatos de tejido uterino de ratona (Haber y col., 1970), rata y coneja (Erdö, 1984a) pero en muy pequeñas cantidades (Haber y col., 1970, Erdö, 1984a).

Los trabajos realizados por Erdö (1984a) mostraron una distribución segmentaria de la actividad GAD en el oviducto de rata, con el ampulla mostrando el doble de actividad respecto al istmo. Los estudios realizados sobre capas del istmo de rata, mostraron una ocurrencia predominante de la actividad GAD en la mucosa, con una actividad 5 veces menor en las capas musculares y ausencia de actividad específica en la serosa (Murashima y Kato, 1984, 1986).

Los niveles relativamente bajos de GAD en el oviducto de rata y la concentración extremadamente alta de GABA en este tejido sugieren que otros caminos biosintéticos podrían contribuir a la formación de GABA. Por otra parte, en la rata, los niveles altos de GABA oviductales acumulados luego de la muerte (Erdö, 1984c) -como consecuencia del bloqueo de las enzimas que lo degradan y el mantenimiento de la actividad GAD post-mortem- no pueden ser explicados por la moderada actividad GAD encontrada en la trompa de Falopio.

En el oviducto de rata, como paso alternativo biosintético, se demostró la conversión *in vivo* de  $^{14}\text{C}$ -putrescina a  $^{14}\text{C}$ -GABA (Orensanz y col., 1983) y la síntesis de GABA a partir de ácido glutámico (Orensanz y col., 1986).

La enzima GABA-T, responsable de la degradación del GABA en el cerebro (Wu, 1976) está también presente en homogenatos crudos de oviducto de rata (Martín del Río, 1981). La actividad enzimática GABA-T tubárica es menor que la del cerebro (Erdö, 1986) y no puede ser completamente bloqueada por las concentraciones usuales de inhibidores de la actividad GABA-T cerebral *in vitro* (Martín del Río, 1981, Martín del Río y Lopez, 1983). Al tratar ratas con inhibidores de la GABA-T, fallan en elevar los niveles tubáricos de GABA (Erdö y col., 1982, Martín del Río y Lopez, 1983). Por otra parte, como ya se indicara, se ha visto un aumento de la concentración de GABA post-mortem en el oviducto de rata (Erdö, 1984c). Debido a que esta marcada elevación de los niveles de GABA después de la muerte no puede ser debida sólo a una inhibición de la GABA-T inducida por anoxia, parece posible que estuviesen involucradas otras rutas catabólicas dependientes de oxígeno en la degradación del GABA en el oviducto. La GABA-T fue identificada también en el útero de rata (Erdö, 1986).

Estudios histoquímicos demostraron la presencia de reactividad específica de GABA-T en el epitelio y endometrio del oviducto (Amenta y col., 1986; Erdö, 1986), mientras que otros elementos tisulares del oviducto mostraron poco o ningún tipo de actividad enzimática (Erdö y col., 1986). Si bien todos los resultados indican la presencia de GABA, GAD y GABA-T dentro de las mismas células del oviducto de la rata, no hay referencias respecto a la localización de GABA y GAD en el útero.

Por otra parte, se sabe que existe un sistema de captación activo de GABA en el oviducto (Erdö, 1983b, Erdö y col., 1984b; Erdö y Amenta, 1986). Adicionalmente,

Erdö y col. (1984a) demostraron que el GABA puede ser almacenado, al menos en parte, por células probablemente secretoras de la mucosa del oviducto de la coneja.

En la membrana del oviducto de rata se encontró una baja densidad de sitios de unión para  $^3\text{H}$ -GABA específicos (Erdö y Lapis, 1982). En la membrana de la trompa de Falopio de la mujer (Erdö, 1983a) se encontraron sitios de unión de  $^3\text{H}$ -GABA de alta afinidad. También se demostró la existencia de sitios de unión de  $^3\text{H}$ -GABA en útero de rata y coneja (Erdö, 1984a).

En el caso de los sitios de unión uterinos y oviductales se trata de receptores de tipo  $\text{GABA}_A$ . Estos resultados fueron corroborados por experimentos de desplazamiento utilizando muscimol y bicuculina (Erdö y Lapis, 1982; Erdö, 1984a). Además de este tipo de receptores, otros estudios (Bowery y col., 1983; Erdö y col., 1984c; Lazlo y col., 1990) demostraron la presencia de receptores  $\text{GABA}_B$  en oviducto y útero. Adicionalmente, se ha identificado la presencia de receptores  $\text{GABA}_A$  en útero (Amenta y col., 1988) y se propuso que cumplirían una función en la regulación de la motilidad uterina inhibiendo las contracciones (Majewska y Vaupel, 1991; Mahesh y col., 1996). Hedblom y Kirkness (1997) determinaron que estos receptores uterinos contienen en su mayoría una subunidad  $\pi$ , y que la presencia de esta subunidad altera la sensibilidad de los receptores  $\text{GABA}_A$  a la pregnanolona endógena. Akinci y Schofield (1999) establecieron que los receptores  $\text{GABA}_A$  de útero expresan un número menor de subunidades en su composición que los presentes en otros tejidos. A pesar de ello, se ha establecido que la composición de subunidades de los receptores  $\text{GABA}_A$  del útero de rata varían durante la gestación (Fujii y Mellon, 2001).

## **1.7. PRESENCIA DE GABA EN EL OVARIO**

El GABA ha sido detectado en el ovario de rata y de humanos. A continuación, se presentan los valores encontrados en este órgano por distintos autores (Tabla V).

Dentro de los valores determinados para el GABA ovárico, se diferencian dos tipos de resultados obtenidos. Mientras que Schaeffer y Hsueh (1982), Erdö (1984b) y Fernandez-Pardal y col. (1984) encontraron aproximadamente  $0.5 \mu\text{mol}$  de GABA/g de tejido, que es una alta concentración para tejidos periféricos; Martín del Río (1981) y Apud y col. (1984) detectaron valores bajos ( $0.04$ - $0.1 \mu\text{mol}$  de GABA/g de tejido) y que son similares a los presentes en la mayoría de los tejidos no neurales. Estas diferencias

no estarían relacionadas con la fase del estro de los animales analizados ni la línea animal utilizada, sino que parecería depender del procedimiento analítico utilizado para la determinación del GABA.

Tabla V. Concentraciones de GABA en el ovario de algunas especies de mamíferos.

<b>TEJIDO</b>	<b>ESPECIE</b>	<b>CONCENTRACIÓN DE GABA</b> ( $\mu\text{mol/g}$ de tejido)	<b>REFERENCIA</b>
	Rata	0,04	Martín del Río, 1981
		0,1	Apud y col., 1984
Ovario		0,51	Erdö, 1984b
		0,54	Schaeffer y Hsueh, 1982
		0,55	Fernandez-Pardal y col., 1984
	Humano	0,21	Erdö y Laszlo, 1984
		0,214	Tanaka, 1985

La presencia de la enzima GAD en el ovario también ha sido establecida (Schaeffer y Hsueh, 1982; Apud y col., 1984; Erdö, 1984b; Duvilanski y col., 1985). Si bien la localización del GABA y GAD en las células ováricas no ha sido determinada, se estableció la ausencia de cantidades medibles de GABA y GAD en las células de la granulosa de ratas inmaduras (Schaeffer y Hsueh, 1982).

Al menos tres procesos fisiológicos pueden contribuir a la presencia de GABA en el ovario: 1) la captación desde el fluido extracelular, 2) la síntesis en un posible componente gabaérgico del ovario de inervación extrínseca, y 3) la síntesis en las células parenquimales o en las del estroma.

La existencia de un proceso de captación de GABA en el ovario requiere de la presencia de aminoácidos en el fluido extracelular y de un sistema de transporte de GABA.

Desde que se estableció que la concentración de GABA en el citoplasma es aproximadamente  $0.6 \mu\text{moles/ml}$  (Gerber y Hare, 1980) y desde que Erdö (1984b) describió un sistema de captación en preparados de ovario de rata, los requerimientos para la presencia de GABA en el ovario a través de un proceso de captación fueron intensamente estudiados. Sólo una pequeña porción de las células ováricas son capaces

de almacenar GABA (Erdö, 1983b), según lo demostró este autor en estudios *in vitro*. En estos estudios también demostró que la captación de GABA *in vitro* era dependiente de Na<sup>+</sup> y de la temperatura. Además, también demostró que la captación fue débilmente inhibida por el uso de ouabaína y de ácido d,l-nipecótico, mientras que el uso de β-alanina produjo una inhibición marcada.

### **1.7.1. Metabolismo del GABA en el ovario**

El ácido glutámico, precursor conocido del GABA en el sistema nervioso central, puede ser también una fuente metabólica para el GABA ovárico (Erdö, 1984b).

Adicionalmente, como ya hemos comentado, el GABA ovárico puede formarse a partir de la putrescina. Esto fue establecido por Andersson y col. (1980) que demostraron en ratas inmaduras que el GABA es el mayor metabolito formado *in vitro* a partir de <sup>14</sup>C-putrescina via una deaminación oxidativa y que la formación de GABA aumenta en el ovario de ratas previamente tratadas con gonadotrofina sérica de yegua preñada (PMSG).

La degradación del GABA ocurre por la acción de la enzima GABA-T (Schousbe y col., 1980). Esta enzima no ha sido descrita en el ovario, pero se ha visto un incremento en un 300% de los niveles de GABA en el ovario después de 12 días de administración oral de etanolamina-O-sulfato, un inhibidor de la GABA-T (Fowler y John, 1972; Martin del Rio y col., 1986). Por otra parte, Erdö (1984c) determinó un incremento del GABA ovárico post-mortem, que puede ser interpretado como el resultado de la inhibición de la enzima GABA-T (Shank y Aprison, 1971).

Con respecto al posible papel del GABA en el ovario, se ha sugerido desde hace tiempo que el GABA podría ser un neurotransmisor en el plexo entérico de los mamíferos (Jessen y col., 1979). Si efectivamente el GABA actuase como neurotransmisor, debería cumplir con una serie de criterios, tales como presencia del GABA, existencia de una enzima que lo sintetice, y un mecanismo para la inactivación sináptica (captación). Todos estos requisitos han sido demostrados (Martin del Rio y col., 1986). Un cuarto criterio es la existencia de receptores postsinápticos. Y el ovario contiene sitios de unión para GABA (Erdö y László, 1982; Erdö y László, 1984).

Sin embargo, la existencia de estos sitios de unión, que sugerirían un potencial papel del GABA como neurotransmisor en el ovario, también podría ser simplemente indicativo de sitios de reconocimiento en el ovario para el GABA circulante.

Otro papel para el GABA en el ovario podría ser como cofactor hormonal (Erdö y col., 1985). En este aspecto, se ha demostrado un efecto modulador del GABA sobre la musculatura vascular en perros (Suzuki y col., 1984) y en arterias basilares de conejo (Anwar y Mason, 1982).

Finalmente, podemos mencionar que Dolci y col. (1985) estudiando la sensibilidad al GABA de ovocitos de ratón y humanos sugirieron que el GABA incrementa el  $Ca^{2+}$  intracelular en éstos. Recientemente, Zhang y col. (2000) reportaron que el GABA inhibe la producción de progesterona en células luteales cultivadas de ovario de rata.

Adicionalmente, Akinci y Schofield (1999) reportaron que los receptores  $GABA_A$  presentes en el ovario poseen una variabilidad mayor de subunidades que los que componen a los receptores presentes en otros tejidos.

### **1.8. PRESENCIA DE GABA EN EL APARATO REPRODUCTOR MASCULINO**

La presencia de GABA en los testículos de rata y el efecto estimulador de este neurotransmisor sobre la producción de testosterona fue primeramente establecido por Ritta y Calandra (1986) y Ritta y col. (1987). Estos mismos autores (Ritta y col., 1991) demostraron que las membranas de las células de Leydig contenían receptores  $GABA_A$  y  $GABA_B$ , los que podrían mediar el efecto estimulador del GABA en la producción de andrógenos *in vitro*. Estas observaciones apoyan un papel funcional del GABA en el control neuroendócrino de la gónada masculina (Geigerseder y col., 2003).

La presencia de la enzima GAD en los testículos de rata, cobayo, ratón, mono y humanos fue establecida por Persson y col. (1990); y en hamster por Frungieri y col. (1996). Por métodos de inmunohistoquímica y biología molecular, demostraron que la GAD se expresa en espermatocitos y espermátides en los túbulos seminíferos del testículo de ratas. Kanbara y col. (2005) localizaron por inmunocitoquímica receptores  $GABA_B$  en espermátidas de rata. Estos resultados fueron luego confirmados por otros grupos (Tillakaratne y col., 1992; Faulkner-Jones y col., 1993; Geigerseder y col., 2003).

En 1996, Frungieri y col. establecieron la presencia de GABA en testículo y epidídimo de hamster, y demostraron la variación fotoperiódica de las concentraciones del mismo en estos tejidos, postulando una acción moduladora autócrina o parácrina para el GABA en las gónadas.

Los niveles de GABA han sido medidos en los órganos reproductivos masculinos de ratas por diversos autores (Bowery y col., 1981; Erdö y col., 1983; Erdö, 1985). Los resultados de esos estudios indicaron que los niveles en el vaso deferente son  $288 \pm 24$  nmol/g de tejido húmedo, en próstata de  $254 \pm 5$ , en epidídimo de  $157 \pm 17$ , en vesícula seminal de  $116 \pm 54$  y en testículo de  $52 \pm 14$  (Erdö, 1985). En plasma seminal humano, Leader y col. (1992), utilizando cromatografía de intercambio iónico fluorométrica determinaron una concentración de GABA de  $103.3 \pm 28.2$   $\mu$ M, mientras que la concentración plasmática indicó  $0.39 \pm 0.03$   $\mu$ M. Ritta y col. (1998) para semen humano, determinaron una concentración de GABA en plasma seminal de  $15.21 \pm 1.16$  nmoles/ml y en espermatozoides de  $0.036 \pm 0.002$  nmoles/ $10^6$  células utilizando un ensayo de radioreceptor.

Por otra parte, se sabe que el GABA tiene un efecto inmediato sobre la aglutinación y motilidad de los espermatozoides de gallo, que podría ser mediado por receptores específicos en la membrana celular del espermatozoide (Boldizsar y col., 1992). Estos estudios sugirieron que la presencia del GABA en el fluido seminal y el fluido uterotubárico podría contribuir a la movilización del espermatozoide. Por otra parte, el GABA dentro del espermatozoide podría también participar en la movilidad del mismo a través de la generación de energía por medio de caminos metabólicos alternativos (Persson y col., 1990).

La existencia de receptores GABA<sub>A</sub> fue demostrada en espermatozoides de cerdo y carnero (Erdö y Wekerle, 1990), de humanos (Wistrom y Meizel, 1993; Ritta y col., 1998), de rata (Hu y col., 2002a) y de bovinos (Ritta y col., 2004).

Adicionalmente, Wistrom y Meizel (1993) postularon un posible papel para el GABA en la reacción acrosómica de espermatozoides humanos. Según estos autores y Shi y col. (1997), la progesterona secretada por el cumulus podría potenciar la acción del GABA oviductal sobre los espermatozoides *in vivo*. Estos autores junto a Shi y Roldan (1995a) también demostraron que en la reacción acrosómica inducida por progesterona, ésta actuaría a través de un canal de cloro asociado al receptor GABA<sub>A</sub> que no necesariamente debería ser idéntico al receptor neuronal.

Turner y Meizel (1995) y Meizel (1997) establecieron que la reacción acrosómica inducida por progesterona está precedida por una salida de Cl<sup>-</sup> desde el espermatozoides y que dicha salida puede ser inhibida por picrotoxina y bicuculina. Somanath y col. (2000) y Somanath y Gandhi (2002), trabajando con espermatozoides de cabra también

inhibieron la reacción acrosómica inducida por progesterona por el uso de picrotoxina y bicuculina. En concordancia con estos resultados, Foresta y col. (1993) habían previamente reportado que la progesterona producía una despolarización de la membrana en espermatozoides humanos. Completando esta interpretación, distintos autores (Tesarik y col., 1996; Aitken 1997b; Meizel, 1997; García y Meizel, 1999b) sugirieron que esta despolarización controlaría la apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje y consecuentemente, la entrada importante de  $\text{Ca}^{2+}$  que llevaría a la reacción acrosómica. Otro posible papel para la progesterona mediando la despolarización debida a la salida de  $\text{Cl}^-$  está basado en el requerimiento de  $\text{HCO}_3^-$  durante la reacción acrosómica inducida por progesterona en espermatozoides humanos (Sabeur y Meizel, 1995; Aitken y col., 1998, Purohit y col., 1998). En este sentido, la despolarización debida a la salida de  $\text{Cl}^-$  podría incrementar la actividad de un cotransportador  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  espermático, incrementando el  $\text{HCO}_3^-$  intracelular como ha sido sugerido para células somáticas (Fitz y col., 1993). En espermatozoides de ratón, Shi y Roldan (1995b) demostraron que el bicarbonato no es necesario para inducir reacción acrosómica por el uso de progesterona. Estos autores (1995a) demostraron que la proporción de espermatozoides de ratón previamente capacitados que sufrían reacción acrosómica era similar al utilizar  $0.5 \mu\text{M}$  de GABA que con  $15 \mu\text{M}$  de progesterona. Además postularon que la acción de la progesterona es mediada por un receptor  $\text{GABA}_A$  y asociada a una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Idéntica conclusión postularon Kuroda y col. (1999) en espermatozoides humanos. El aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular por acción de la progesterona ya había sido demostrada en la reacción acrosómica de espermatozoides humanos (Blackmore y col., 1991; Meizel y Turner, 1991; Pillai y Meizel, 1991; Aitken y col., 1996) y de hamster (Llanos y col., 1993; Mendoza y col., 1995).

Sin embargo, Blackmore y col. (1994) postularon que la progesterona podría interactuar con dos receptores de la superficie celular del espermatozoide humano, uno que media el influjo rápido de  $\text{Ca}^{2+}$  y otro que es un receptor  $\text{GABA}_A$  que media el flujo de  $\text{Cl}^-$ . Estos autores postularon además que el sitio de unión de la progesterona en el receptor  $\text{GABA}_A$  no sería el sitio de unión para esteroides. En contraposición a las teorías recién expresadas, Aitken y col. (1996), trabajando en espermatozoides humanos, postularon que la acción de la progesterona no involucraría ni la mediación de receptores  $\text{GABA}_A$ ,



ni de canales de calcio dependientes de voltaje, ni pasos que involucren a la fosfolipasa C ni a proteínas G.

De este modo, aún persisten diferentes puntos de vista respecto a la naturaleza del receptor no genómico de progesterona. Este sería un receptor de superficie que tendría las propiedades de un canal de calcio, de un canal de cloro, de un intercambiador bicarbonato/cloruro y de un receptor GABA<sub>A</sub> (Purohit y col., 1998).

La reacción acrosómica inducida por GABA fue demostrada en espermatozoides previamente capacitados de ratón (Roldan y col., 1994; Shi y Roldan; 1995a; Murase y Roldan; 1996; Espinoza y col., 1998), de cobayo (Shi y col., 1996; Yuan y col., 1999; Zhang y col., 2000; Chen y col., 2005), de musaraña (Cao y col., 1997), de rata (Hu y col., 2002b) y de humanos (Wistrom y Meizel, 1993; Hall y col., 1996; Shi y col., 1997; Calogero y col., 1999; Yuan y col., 1998; Zhang y col., 2000). El efecto del GABA en la reacción acrosómica mediado tanto por receptores GABA<sub>A</sub> como por receptores GABA<sub>B</sub> fue postulado para espermatozoides humanos (Calogero y col., 1999) y de rata (Hu y col., 2002b).

Shi y col. en 1997 y Calogero y col. en 2000 postularon que el efecto del GABA en la reacción acrosómica está mediado por una entrada de Ca<sup>2+</sup> extracelular. Roldan y col. (1994) estudiaron en espermatozoides de ratón el efecto de la progesterona y el GABA en la producción de diacilglicerol (DAG) y en la reacción acrosómica. Estos autores demostraron que tanto los niveles espermáticos de DAG como el porcentaje de espermatozoides que sufrieron reacción acrosómica aumentaron en presencia de ambos compuestos y que ambos efectos se vieron inhibidos en presencia de la adición de bicuculina al medio. En contraposición a estos resultados, Aitken y col. (1996) trabajando con concentraciones de GABA entre 0.5-100 μM no encontraron efecto en el aumento de calcio intracelular en espermatozoides previamente capacitados así como tampoco lo encontraron al utilizar muscimol (agonista) en concentraciones entre 5-50 μM. En concordancia con este resultado, Aanesen y col. (1995) y Luconi y col. (1998a) tampoco encontraron efecto del GABA en la reacción acrosómica de espermatozoides humanos. Chen y col. (2005) involucraron al GABA en la modulación de la PLA2 durante la reacción acrosómica en espermatozoides de cobayo.

Burrello y col. (2004) propusieron que en la reacción acrosómica inducida por fluido folicular en espermatozoides humanos estarían involucrados tanto receptores GABA<sub>A</sub> como GABA<sub>B</sub>.

Adicionalmente, Calogero y col. (1996, 2000) y Ritta y col. (1998) postularon un efecto del GABA en la hiperactivación de los espermatozoides humanos y Bian y col. (2002) un efecto sobre la actividad acrosina espermática.

La importancia del GABA en la reproducción humana debe aún ser dilucidada, pero su presencia en el semen humano en cantidades significativas sugiere que podría desempeñar un papel regulatorio en la motilidad del espermatozoide, en la esteroidogénesis hormonal, y/o en la secreción del fluido seminal (Tsuji y Nakajima, 1978; Napoleone y col., 1990). Las propiedades inmunomodulantes podrían también servir para disminuir la respuesta inmunológica de la hembra a los antígenos del espermatozoide (Petitto y col., 1990; Scatton y col., 1990).

De lo expuesto hasta aquí, surge que si bien el efecto del GABA ha sido intensamente estudiado en distintos tejidos y sistemas, los resultados publicados son en algunos casos contradictorios y en la mayoría de ellos incompletos. Esto nos llevó a considerar de interés el estudio del efecto del GABA en una etapa particular del proceso reproductivo como es la capacitación del espermatozoide, utilizando el modelo animal del carnero debido a la disponibilidad de estos animales y al mismo tiempo, el interés agropecuario en el desarrollo de tecnologías de tipo reproductivas para estos animales que constituyen un grupo de interés en la actividad ganadera de importantes áreas de nuestro país.

## 2. OBJETIVOS

La presente Tesis investigó la interacción entre el GABA y los espermatozoides de carnero en condiciones *in vitro*. Nuestra hipótesis inicial fue que los espermatozoides de carnero podrían tener proteínas específicas de unión para el GABA y que la unión del GABA a estos sitios podrían afectar la función espermática. Durante el desarrollo de la tesis, nos planteamos una serie de objetivos: •Estudiar el efecto del ácido gama-aminobutírico en la capacitación *in vitro* de espermatozoides de carnero; •Demostrar el papel del GABA oviductal en la capacitación de espermatozoides de carnero; •Estudiar la fosforilación en residuos tirosina de proteínas asociada a la capacitación de espermatozoides de carnero por GABA.

Para ello fue necesario poner a punto una serie de técnicas que no habían sido validadas en el espermatozoide de carnero y que fueron las siguientes: •Determinación de la motilidad de los espermatozoides de carnero con un analizador computarizado de imágenes; •Determinación de la viabilidad de los espermatozoides por el uso de fluorocromos; •Determinación de la integridad de la membrana acrosomal en espermatozoides viables utilizando simultáneamente lectinas y un fluorocromo indicador de viabilidad; •Evaluación de la capacitación de los espermatozoides utilizando la técnica de unión de clortetraciclina.

### **3. MATERIALES Y METODOS GENERALES**

#### **3.1. MATERIALES**

##### **3.1.1. Reactivos**

El Dimetilsulfóxido y el metanol fueron provistos por Merck (Darmstadt, Alemania). El metilen-<sup>3</sup>H-muscimol, 5-20 Ci/mmol, fue comprado a New England Nuclear (Boston, MA, USA). La N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED), acrilamida y bisacrilamida usada fue comprada a Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Los estándares de peso molecular pre-marcados (lisozima 15,350;  $\beta$ -lactoglobulina 18,850; anhidrasa carbónica 28,350; ovoalbúmina 43,600; albúmina sérica bovina 69,100; fosforilasa B 106,300 y miosina (cadena-H) 199,100) fueron comprados a BRL-Life Technologies Inc (Gaithersburg, MD, USA). El resto de los reactivos utilizados en la preparación de buffers, diluyentes, medios y soluciones utilizados en esta Tesis fueron de grado analítico provistos por Sigma Chemical Company (St Louis, MO, EEUU).

El formaldehído se preparó por disolución de paraformaldehído en una solución salina de buffer fosfato y posteriormente filtrada por centrifugación.

Todas las soluciones, medios y diluyentes fueron preparadas utilizando agua ultrapura. Las soluciones frescas se prepararon cada semana.

##### **3.1.2. Anticuerpos**

El anticuerpo monoclonal anticadena  $\alpha$  del receptor GABA<sub>A</sub> de la corteza cerebral bovina (clon celular híbrido ratón-ratón bd24) fue comprado a Boehringer-Mannheim (Indianapolis, IN, USA). El anticuerpo anti inmunoglobulina G (IgG) (H + L,  $\kappa$  +  $\lambda$ ) de ratón desarrollado en cabra y conjugado con peroxidasa de rábano fue comprado a KPL (Gaithersburg, MD, USA). El anticuerpo anti IgG de ratón conjugado con FITC desarrollado en cabra fue comprado a Sigma Chemical Company (St Louis, MO, USA). El anticuerpo monoclonal (Clone 4G10, subclase IgG2b, Druker y col., 1989; Baumber y Meyers, 2006) antifosfotirosina de ratón PY-20 utilizado fue comprado a Upstate Biotechnology Incorporated (UBI, Lake Placid, NY, USA)

Las fórmulas para la preparación de todos los medios y soluciones utilizadas se presentan en el Apéndice.

### **3.1.3. Animales**

Se utilizaron carneros Merino australiano adultos (peso promedio 95 kg) y ovejas Corriedale x Merino (56 kg de peso promedio), cuyas edades oscilaban entre los 3 y 5 años. Los estudios se realizaron durante el período reproductivo de estos animales (entre abril y noviembre).

## **3.2. MÉTODOS**

### **3.2.1. Colección de semen**

El semen se colectó utilizando una vagina artificial. Para la obtención de la muestra de semen se colocó a una oveja en celo en un cepo para inmovilizarla, y se esperó a la monta de la misma por parte del carnero. Inmediatamente después de obtenida la muestra en la copa de recolección, se colocó ésta en un baño térmico que contenía agua a 30°C hasta el momento de la evaluación, lo que ocurrió dentro de los 15 minutos posteriores.

### **3.2.2 Evaluación de las muestras de semen**

Una vez colectado el semen, se tomó con una pipeta Pasteur una gota y se colocó entre porta y cubreobjetos. Se diluyó 1:10 con citrato de sodio al 3% y se evaluó en forma subjetiva en un microscopio Olympus™ BH-2 (Olympus Co, New York, NY, USA), descartándose todas aquellas muestras con menos del 70% de espermatozoides móviles.

La determinación de la concentración de espermatozoides se realizó por conteo en cámara de Neubauer luego de una dilución 1:200 en solución de cloramina T para inmovilizarlos. Se realizó la lectura a 400x en microscopio óptico Olympus™ BH-2 (Olympus Co, New York, NY, USA). Para ello se contó el número de espermatozoides en 5 campos de la cámara y al valor obtenido se lo multiplicó por el factor de dilución, obteniéndose de esta manera la concentración de la muestra original expresada en millones de espermatozoides/ml.

### **3.2.3. Congelamiento y descongelamiento de semen**

El semen recién eyaculado se colocó en el interior de un tubo plástico de 50 ml (Falcon 352098, Becton Dickinson, NJ, USA), se tomó una alícuota del mismo y se evaluó la movilidad y concentración. Una vez finalizadas estas tareas, se lo diluyó en baño térmico a 30°C hasta una concentración final de  $5 \times 10^8$  espermatozoides/ml utilizando los Diluyentes 1 y 2 (descritos en Apéndice). Para ello, en una primera etapa se adicionó un volumen del Diluyente 1 (previamente calentado a 30°C) correspondiente al 50% del volumen total de diluyentes a agregar, y se lo dejó en el baño térmico en estas condiciones durante 15 minutos, pasados los cuales se agregó el 50% del volumen restante correspondiente al Diluyente 2. La muestra diluída contenida en el tubo plástico, se colocó en el interior de un vaso de precipitados de vidrio que contenía 300 ml de agua a 30 °C en su interior, y se lo llevó a heladera, enfriándose en estas condiciones durante 100 minutos, con un gradiente de enfriamiento de 0,2 °C/min. Una vez llegada la muestra a 10°C, se adicionaron al agua del vaso de precipitados tres cubos de hielo, dejándose en estas condiciones durante 20 minutos, en un gradiente de 0,3 °C/min. Concluido este tiempo, la muestra a 4°C se congeló en forma de pastillas de 0,2 ml sobre hielo seco. Una vez concluida la formación de las pastillas, estas se sumergieron en un termo de nitrógeno líquido a -196 °C.

El descongelamiento de las pastillas de semen se realizó en baño térmico a 37°C en el interior de tubos de Kahn. Para ello se tomó con una pinza una pastilla de semen y se la colocó en el interior del tubo Kahn, el cual se agitó vigorosamente en el agua del baño durante aproximadamente 70 segundos.

### **3.2.4. Test de termorresistencia**

Para la realización del test de termorresistencia, el semen descongelado se diluyó con igual volumen de Diluyente para Test de Termorresistencia (descrito en Apéndice) y se colocó a 37°C en baño térmico durante 8 horas (test de termorresistencia). Cada 2 horas se tomaron alícuotas para la evaluación de la movilidad y viabilidad y se le adicionaron con una micropipeta, 500 µl de Diluyente para Test de Termorresistencia.

### **3.2.5. Capacitación *in vitro* de los espermatozoides de carnero**

La capacitación de los espermatozoides se realizó según lo descrito por Pugh y col. (1991) con las siguientes modificaciones:

Alícuotas de semen conteniendo  $8 \times 10^8$  espermatozoides, se lavaron 3 veces en 8 ml de PBS (buffer fosfato salino) conteniendo 3 g/l de BSA (albúmina sérica bovina) y fueron centrifugadas a 500 x g durante 10 minutos, a temperatura ambiente. El sedimento fue resuspendido en 0,5 ml de SOF (fluído oviductal sintético, Tervit y col. (1972)) conteniendo 15 mM de Hepes (pH 7,4) y centrifugado durante 10 minutos a 500 x g. El sedimento fue finalmente resuspendido en un medio (SOF-m), descrito en el Apéndice, suplementado con 20% de suero de oveja en estro inactivado por calor (pH 7,36, 290 mOsm/kg). Muestras de 1 ml fueron incubadas en estufa gaseada a 38,5°C en placas multiviales, bajo atmósfera humidificada de 5% de CO<sub>2</sub> en aire.

## **4. CAPITULO I: Puesta a punto de un analizador computarizado de imágenes para la evaluación de la movilidad de espermatozoides en muestras de semen de carnero y su aplicación en la determinación de los parámetros cinéticos espermáticos en muestras de semen frescas y congeladas/descongeladas.**

### **4.1 INTRODUCCION**

La determinación de la calidad del semen es un aspecto importante en un laboratorio de reproducción tanto humana como animal. El procedimiento más común para este fin, es la estimación subjetiva a nivel de microscopía. La movilidad es un parámetro que puede ser fácilmente estimado pero está sujeto a errores debidos a variaciones individuales entre observadores (Davis y Boyers, 1992). Diversos métodos fueron descriptos con el objeto de lograr una evaluación objetiva de la movilidad. Los más ampliamente difundidos fueron (Hynie, 1962; Janick y Mac Leod, 1970; Ishii y col., 1977; Jouannet y col., 1977; Sokoloski y col., 1977; Atherton y col., 1978; Makler, 1978; Makler y Blumenfeld, 1980; David y col., 1981; Katz y Overstreet, 1981; Jenks y col., 1982; Serres y col., 1984; Marin y col., 1995):

- a) el conteo por pasaje
- b) los métodos turbidimétricos y nefolométricos
- c) la velocimetría laser Doppler
- d) la fotomicrografía por exposición de tiempo
- e) la fotomicrografía de exposición múltiple
- f) la microcinematografía
- g) la videomicrografía

El análisis digital computarizado de imágenes aparece como una posibilidad práctica con el desarrollo de microcomputadoras progresivamente más veloces (Glazzard y col., 1983) y permite la introducción de los analizadores de movilidad espermática en tiempo real. Estos aparatos son denominados en forma colectiva instrumentos analizadores de



espermatozoides con ayuda de computadora (CASA, según la sigla en inglés, Boyers y col., 1989).

Los sistemas de análisis de semen que utilizan un analizador computarizado de imágenes permiten, además de la estimación de la movilidad, una evaluación precisa de otros parámetros relacionados con el movimiento que son imposibles de evaluar por métodos subjetivos (Katz y col., 1985; Krause, 1995). En conjunto, estos valores permiten una evaluación más detallada de la calidad del semen (Verstegen y col., 2002). En contraposición, los sistemas computarizados deben ser cuidadosamente calibrados para obtener resultados comparables (Ginsburg y col., 1988; Aenesen y Benvold, 1989; Davis y Boyers, 1992; Holt y col., 1994).

El Sistema de Análisis Automatizado de Espermatozoides CellTrak/S<sup>TM</sup> (Motion Analysis Co, Santa Rosa, CA, USA) fue diseñado para los análisis computarizados de semen, permitiendo la determinación de los parámetros cinéticos de los espermatozoides.

El CellTrak/S es un equipo complejo cuya función principal es el análisis de partículas en movimiento. Dicho análisis se efectúa a través del cálculo de los parámetros de movimiento o cinéticos. En nuestro caso, las partículas en movimiento son los espermatozoides. El análisis se logra utilizando una cámara de video acoplada a un microscopio provisto con un sistema de contraste de fases con el que se consigue diferenciar ópticamente a los espermatozoides del fondo. En dicho microscopio se deposita la muestra de semen diluído cuya imagen es trasladada a un circuito que se encarga de transformar la información visual en información numérica, la cual es factible de ser manejada por una computadora acoplada al sistema. Con los datos numéricos se reconstruye la trayectoria de todos los espermatozoides detectados y a partir de esta instancia se puede calcular su velocidad y otros parámetros cinéticos, además del porcentaje de espermatozoides móviles y concentración de la muestra, los cuales son informados al final del análisis.

La trayectoria de la cabeza del espermatozoide produce la imagen de una curva pseudosinusoidal, que se puede caracterizar en términos de amplitud y velocidad (Gomez y col., 1996), como se indica en la Figura 1.

Para cada trayectoria correspondiente a un espermatozoide, el CellTrak/S calcula los siguientes parámetros (Boyers y col., 1989; Davis y Boyers, 1992):

- \* Velocidad progresiva o rectilínea (VSL), que representa la distancia en línea recta recorrida por unidad de tiempo.
- \* Velocidad curvilínea o de la trayectoria (VCL), que representa la distancia recorrida por la cabeza del espermatozoide por unidad de tiempo.
- \* Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide respecto de su línea de avance (ALH) y es utilizado como una aproximación del batido flagelar .
- \* Velocidad media de la trayectoria (VAP), que expresa la velocidad media con la que la cabeza del espermatozoide recorre su trayectoria espacial.
- \* Linealidad de la trayectoria (LIN), como el cociente entre  $VSL/VCL$ .

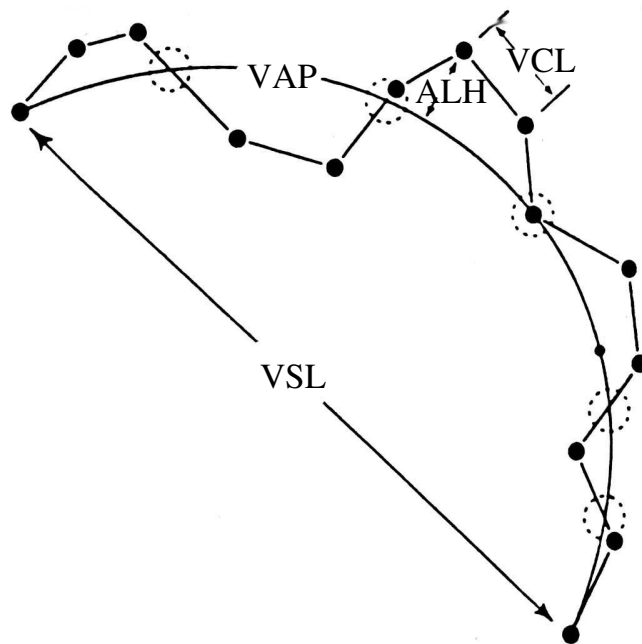


Figura 1: Representación gráfica de la trayectoria de la cabeza del espermatozoide y de los parámetros cinéticos calculados para cada espermatozoide por el Sistema de Análisis Automatizado de Espermatozoides CellTrak/S™.

Para determinar la concentración espermática (CON) y el porcentaje de espermatozoides móviles (MOT) se utiliza la totalidad de la muestra de semen analizada. Es fundamental para un correcto uso, una calibración apropiada del sistema.

El proceso de calibración del CellTrak/S permite que el equipo se encuentre en condiciones de distinguir electrónicamente a los espermatozoides del medio que los rodea, poder separar los espermatozoides que poseen movimiento de los inmóviles y la reconstrucción, con errores mínimos, de las trayectorias efectuadas por los espermatozoides móviles analizados. Esto último es de gran importancia debido a que los cálculos de cinética espermática dependen de las trayectorias reconstruídas por la computadora (Wetzels y col., 1993; Kraemer y col., 1998; Rijsselaere y col., 2003).

Cabe señalar que el CellTrak/S fue diseñado para su uso exclusivo en espermatozoides humanos, y que el espermatozoide de carnero difiere del humano tanto en su tamaño y morfología como en sus parámetros cinéticos, lo cual obligó a la recalibración total del sistema para su aplicación en este trabajo de Tesis.

Por otra parte, se sabe que las alteraciones en la movilidad reducen la capacidad fecundante de los espermatozoides (Bedford y Hoskins, 1990). Los espermatozoides anormales generalmente no muestran grandes diferencias en el tipo y calidad de movilidad, pero son incapaces de atravesar la barrera cervical (Katz y col., 1990). El semen congelado-descongelado muestra una capacidad fecundante menor que el semen fresco (Shannon, 1978; Colas, 1984; Evans y Maxwell, 1987). Esta diferencia puede deberse, al menos en parte, a alteraciones en la estructura de la membrana y en las características cinéticas (Holt y North, 1986; Ikeda y col., 2002). Teniendo en cuenta esto último, los métodos que utilizan sistemas computarizados de análisis de imágenes para la evaluación de semen podrían permitir evaluar la calidad de muestras de semen en mucho más detalle que por medio de métodos subjetivos.

A continuación se detallará la metodología llevada a cabo para la calibración del sistema CellTrak/S<sup>TM</sup> para su uso en semen ovino, así como los resultados obtenidos en la evaluación de semen fresco y congelado-descongelado de carnero, con la calibración propuesta.

## **4.2 METODOS**

### **4.2.1. Determinación de los parámetros cinéticos**

El equipo utilizado fue un Microscopio Olympus™ BH-2 (Olympus Co, New York, NY, USA) suplementado con una platina térmica a 37 °C y con una cámara de video adosada.

Las muestras de semen fresco fueron diluídas en Diluyente 2 de congelamiento (ver Apéndice) hasta obtener entre 30 y 40 espermatozoides por campo microscópico a un aumento de 200x. Se tomaron alícuotas de 1 a 2 µl, se colocaron en una cámara Makler (Selfi-Medical Instrument Ltd, Haifa, Israel) y fueron observadas en el microscopio. Las imágenes fueron capturadas a una velocidad de 60 cuadros por segundo y grabadas en una cinta de video para posteriores análisis. Después de la digitalización de los cuadros, se calcularon las coordenadas de cada espermatozoide en cada momento de tiempo, permitiendo la identificación del recorrido individual de cada espermatozoide para la posterior evaluación de los parámetros cinéticos.

Este procedimiento permite la comparación de la precisión de los diferentes arreglos de calibración o setups, utilizando la misma secuencia de eventos o trayectos correspondientes a los distintos espermatozoides analizados.

### **4.2.2. Determinación del número mínimo de campos y espermatozoides**

El objetivo de esta serie de ensayos fue determinar el tamaño apropiado de la muestra, expresado en número de campos a observar o número de espermatozoides a analizar, para que las variaciones de todos los parámetros cinéticos analizados sean mínimas. Para ello se utilizaron 11 muestras de semen fresco y sus respectivos congelados/descongelados que fueron grabadas en una cinta de video. Se analizaron entre 20 y 30 campos por cada cámara de Makler cargada con 1 µl de muestra, y se calcularon acumulativamente, los parámetros CON, MOT, VCL, VSL, LIN y ALH.

Para cada parámetro, se definió la función Variación (V):

$$V = P_n / P_{n-1}$$

Donde  $P_n$  es el valor de un dado parámetro calculado luego de  $n$  campos, y  $P_{n-1}$  es el mismo valor después de  $n-1$  campos. En estas condiciones, es de esperar que esta

función V converja hacia 1 a medida que el número de espermatozoides analizados aumente. El valor de V fue graficado respecto al número de campos o número de espermatozoides analizados.

#### **4.2.3. Determinación de errores de trayectoria**

Para cada versión del arreglo de calibración, se definió el porcentaje de error como:

$$\% ER = Tw / SPZk \times 100$$

y la eficiencia de la reconstrucción de trayectos como:

$$\%R = Tt / SPZt \times 100$$

donde Tw es el número de trayectos reconstruidos en forma incorrecta; SPZk es el número de espermatozoides analizados (o en los que se calculan los parámetros de movimiento); Tt es el número total de trayectos reconstruidos y SPZt es el número total de espermatozoides contados.

#### **4.2.4. Determinación de la velocidad de movilidad mínima del espermatozoide para ser considerado móvil**

Con el objeto de determinar la velocidad por debajo de la cual los espermatozoides son considerados inmóviles, se analizaron 24 campos de 3 cámaras Makler correspondientes a 36 muestras de semen descongelado y las correspondientes derivadas de la incubación durante 8 horas a 37°C de esas muestras descongeladas (con evaluación a las 2, 4, 6 y 8 horas de incubación).

En todos los casos se calculó el porcentaje de espermatozoides móviles (o porcentaje de movilidad) considerando como velocidad mínima a 5, 10, 15, 20 y 25  $\mu\text{m/s}$  respectivamente.

Simultáneamente, se establecieron los valores correspondientes del porcentaje de espermatozoides móviles para todos los casos indicados anteriormente, pero en forma subjetiva.

A continuación, y para facilitar el análisis de los datos, se definió la función porcentaje de descenso de motilidad como:

$$\% De = [1 - (Mn/Mo)] \times 100$$

Donde:  $M_n$  es el valor de movilidad después de  $n$  horas

$M_0$  es el valor de movilidad a  $t=0$

Esta función permite estudiar el lógico descenso de la movilidad de los espermatozoides descongelados que son sometidos a una incubación a  $37^\circ\text{C}$  durante un período largo de tiempo (8 horas en nuestro caso).

#### **4.2.5. Evaluación de los parámetros cinéticos de muestras de semen fresco y sus respectivos descongelados por el uso del CASA con la calibración propuesta**

Se determinaron los parámetros VCL, VSL, LIN, ALH y MOT en 36 muestras de semen fresco, que fueron posteriormente congeladas y descongeladas para una nueva evaluación.

#### **4.2.6. Análisis estadísticos**

Los valores de las muestras frescas y descongeladas fueron analizados por medio de un test  $t$  de Student apareado, después de la transformación angular de los datos, usando el sistema de estadística CSS:Statistica<sup>TM</sup> Module (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

### **4.3. RESULTADOS**

#### **4.3.1. Determinación del número de campos y espermatozoides**

La Figura 2 muestra los cambios en la función  $V$  para los parámetros CON, ALH y MOT como función del número de campos y de espermatozoides analizados. Para los 3 parámetros,  $V$  tiende a 1 cuando el número de campos fue aumentando. Los experimentos realizados utilizando semen congelado/descongelado presentaron resultados similares.

El valor de  $V$  fue menor del 4% cuando se analizaron al menos 16 campos, o lo que es lo mismo, al analizar al menos 175 espermatozoides. Los restantes parámetros (VSL, VCL y LIN) parecen ser mucho más estables, ya que  $V$  se aproxima a 1 para un número menor de espermatozoides analizados.

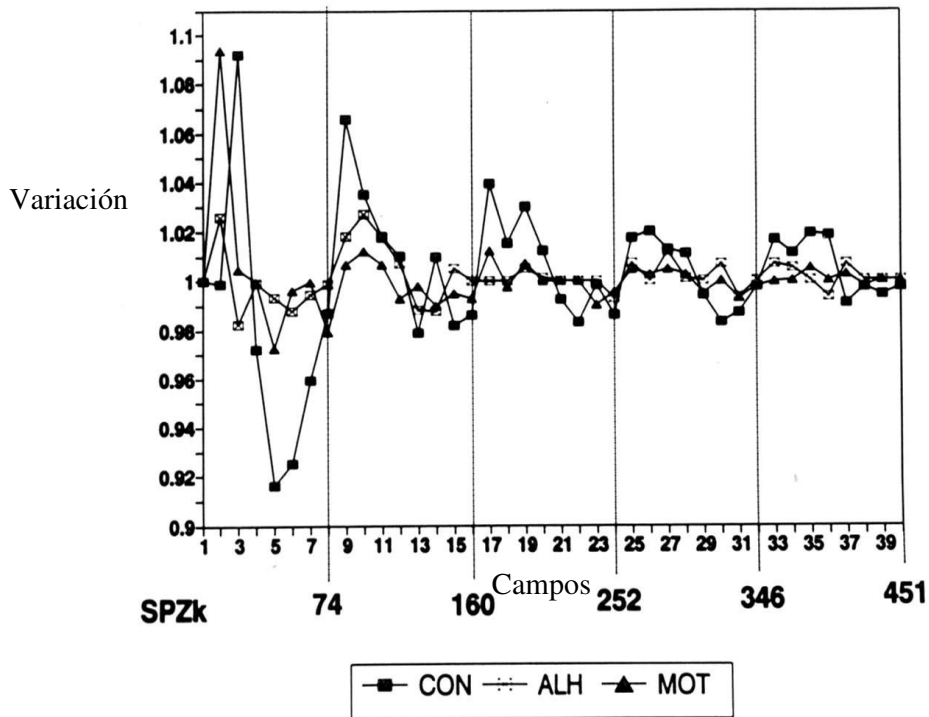


Figura 2. Cambios en la función Variación (V) para los parámetros CON, ALH y MOT en función del número de campos y espermatozoides analizados. Donde: CON: Concentración espermática; ALH: Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza de espermatozoide; MOT: Porcentaje de espermatozoides móviles y SPZk: es el número total de espermatozoides analizados.

#### 4.3.2. Diseño del arreglo de calibración para 60 cuadros por segundo

La Tabla I muestra las variables incluídas en el arreglo de calibración (o “setup”, en inglés), que deben ser ajustadas para optimizar la exactitud de las evaluaciones.

<b>A.</b> Velocidad de toma de cuadros (cuadros por segundo)
<b>B.</b> Duración de la captura de datos (cuadros)
<b>C.</b> Tamaño mínimo de trayecto (cuadros)
<b>D.</b> Velocidad mínima del espermatozoide para ser considerado móvil (micrones/seg)
<b>E.</b> Velocidad máxima de apertura (micrones/seg)
<b>F.</b> Factor de escala de distancia (micrones/píxeles)
<b>G.</b> Velocidad de la cámara
<b>H.</b> Factor de suavizado de la trayectoria para el cálculo del desplazamiento lateral de la cabeza (cuadros)
<b>I.</b> Valor X para formar el centroide que representa la posición del espermatozoide en un sólo punto (píxeles)
<b>J.</b> Valor Y para formar el centroide que representa la posición del espermatozoide en un sólo punto (píxeles)
<b>K.</b> Tamaño mínimo de la cabeza de un espermatozoide (píxeles)
<b>L.</b> Tamaño máximo de la cabeza de un espermatozoide (píxeles)
<b>M.</b> Máxima interpolación entre trayectos (cuadros)
<b>N.</b> Porcentaje de predicción de trayectorias (%)
<b>O.</b> Profundidad de la muestra (micrones)

Tabla I. Variables del arreglo de calibración del Sistema de Análisis Automatizado de Espermatozoides CellTrak/S<sup>TM</sup>. Entre paréntesis figuran las unidades.

En la Tabla II se presentan los valores asignados a las variables de calibración para 9 versiones diferentes de la misma, junto con los valores del % Er y % R para cada versión.



Versión	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>Parámetros</b>									
<b>A</b>	60	60	60	60	60	60	60	60	60
<b>B</b>	25	25	20	20	20	20	20	20	20
<b>C</b>	20	20	20	20	20	20	20	20	19
<b>D</b>	15	15	15	15	15	15	15	20	20
<b>E</b>	800	800	800	800	1000	1000	450	400	400
<b>F</b>	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83
<b>G</b>	1.02	1.02	1.02	1.02	1.02	1.02	1.02	1.02	1.02
<b>H</b>	7	7	7	7	7	7	7	7	7
<b>I</b>	4	4	4	4	4	4	4	4	4
<b>J</b>	2	2	2	2	2	2	2	2	2
<b>K</b>	3	3	3	3	3	3	3	3	3
<b>L</b>	12	12	12	12	12	12	12	12	12
<b>M</b>	1	1	1	0	0	0	1	1	1
<b>N</b>	35	40	40	40	40	53	20	20	20
<b>O</b>	20	20	20	20	20	20	20	20	20
<b>%ER</b>	20	18	11	9	15	12	5.7	5.2	5.5
<b>%R</b>	75	74	78	68	72	72	74	72	78

Tabla II. Valores asignados a las variables de la calibración para 9 versiones diferentes del mismo, junto con los valores del porcentaje de error (% Er) y la eficiencia de la reconstrucción de los trayectos de los espermatozoides (% R) para cada versión.

La calibración de la exactitud de la variable velocidad mínima del espermatozoide para ser considerado móvil (variable D en la Tabla I) es importante para las mediciones de MOT, VSL y VCL, a pesar de que cambios en sus valores no influyen en la eficiencia de la trayectoria. Para corroborar el efecto de los cambios en los valores de D, se determinó el porcentaje de descenso de movilidad en semen congelado-descongelado e incubado durante 8 horas, tanto en forma subjetiva como en forma objetiva con el CellTrak/S, utilizando diferentes valores de D en la calibración. Los valores utilizados variaron entre 5 y 25 micrones/seg. Los resultados se presentan en la Figura 3. Como se puede observar, para todos los tiempos de incubación, el valor 20 micrones/seg para D es el que más se aproxima a los valores obtenidos por los métodos subjetivos.

Como se puede ver, el reajuste de los valores de los parámetros desde las versiones 1 a 9 llevaron el % Er a un 5 % y el % R a un 78 % respectivamente, lo que es ampliamente aceptable para análisis de rutina. De esta manera, quedó configurada la calibración definitiva de nuestro analizador computarizado de imágenes (arreglo N° 9).

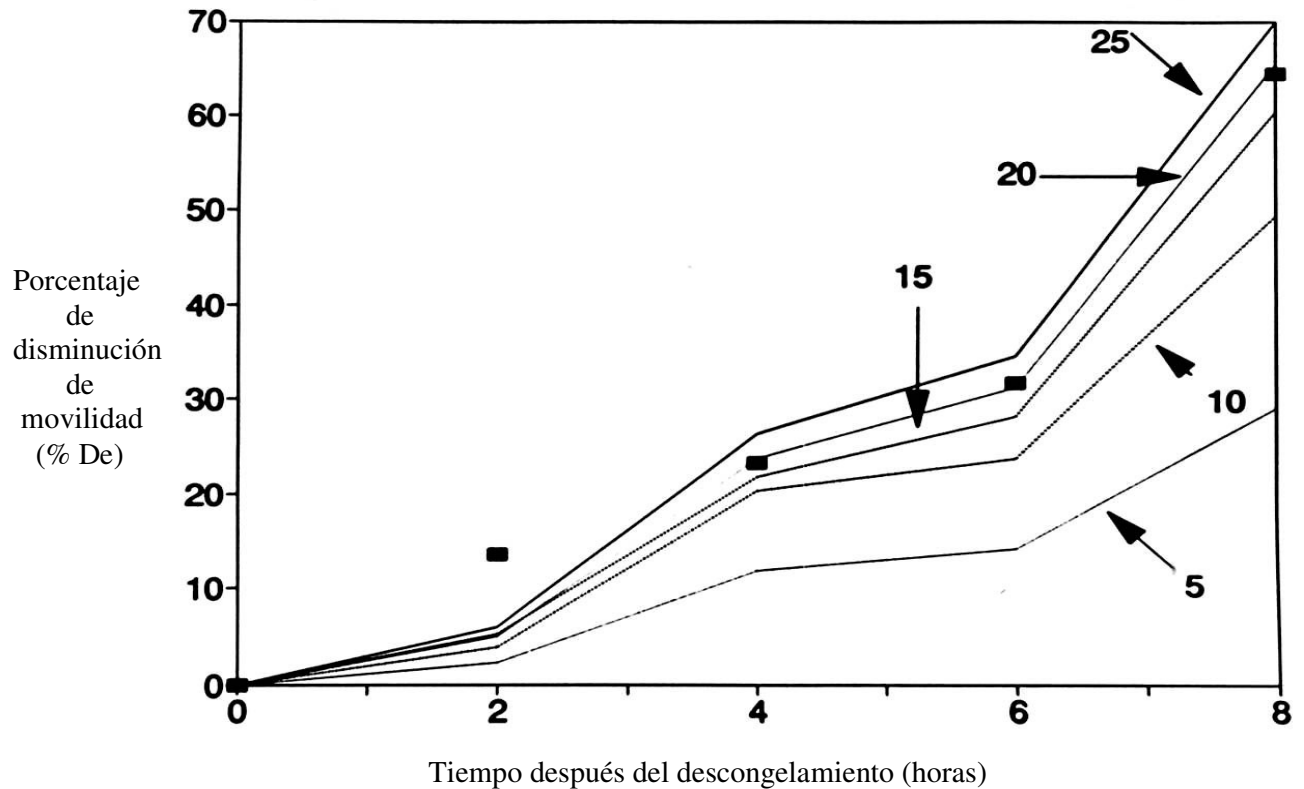


Figura 3. Porcentaje de descenso de la movilidad en función del tiempo de incubación para semen congelado-descongelado mantenido a 37°C. Los números indican los valores del parámetro D en los respectivos arreglos de calibración. Los puntos rectangulares indican los valores obtenidos subjetivamente. Donde D: Velocidad mínima del espermatozoide para ser considerado móvil.

#### 4.3.3. Determinación de la correspondencia entre los valores de movilidad obtenidos en forma subjetiva y automatizada

Para ello se analizaron en forma subjetiva y automatizada con la calibración propuesta un total de 135 muestras de semen descongeladas. Los resultados se presentan en la Figura 4. Como se puede ver en dicha figura, existe una relación lineal ( $r=0.84$ ) indicativa de la exactitud del método computarizado respecto del método subjetivo.

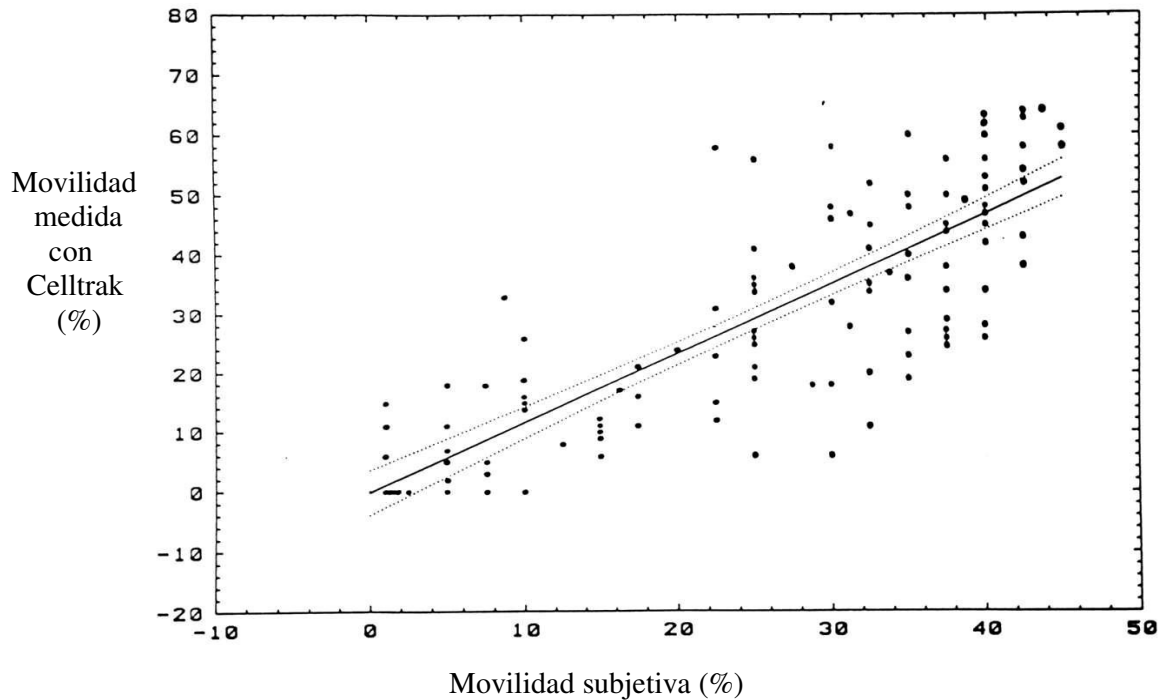


Figura 4. Relación entre el porcentaje de movilidad evaluada subjetivamente y por medio del CellTrakTM. n=135. Las líneas punteadas representan el intervalo de confianza del 95%.  $r=0.84$

#### 4.3.4. Evaluación de los parámetros cinéticos de muestras de semen fresco y sus respectivos descongelados por el uso del CASA con la calibración propuesta

Los resultados se presentan en la Tabla III. Excepto para ALH, todos los parámetros muestran cambios significativos después del congelamiento y descongelamiento. La VCL mostró el descenso menos significativo luego del descongelamiento.

	VCL	VSL	LIN	ALH	MOT
Fresco	$91,2 \pm 12,3$	$72,2 \pm 10,3$	$79,4 \pm 4,8$	$2,5 \pm 0,4$	$90,8 \pm 5,3$
Descongelado	$88,6 \pm 9,8$	$67,6 \pm 8,0$	$76,1 \pm 4,2$	$2,5 \pm 0,3$	$50,3 \pm 11,1$
P	< 0,05	< 0,001	< 0,001	NS	< 0,001

Tabla III. Comparación de los parámetros cinéticos entre muestras de semen fresco y congelado-descongelado. Los valores representan la Media  $\pm$  DS (n=36).

## 4.4 DISCUSION

El procedimiento de calibración descrito en este capítulo nos permitió determinar los parámetros cinéticos de los espermatozoides de carnero utilizando un analizador computarizado, calibrado originalmente para espermatozoides humanos. Un valor aceptablemente bajo de error (5,5%) y un alto porcentaje de reconstrucciones de trayectorias en forma correcta (78%), junto con una relación lineal altamente significativa con los valores de movilidad obtenidos por el clásico método subjetivo, hacen a estos resultados exactos y confiables para el uso en análisis rutinarios de programas de inseminación. Adicionalmente, el desarrollo de una apropiada calibración para la evaluación de muestras de semen tanto fresco como descongelado, hace de este método una herramienta poderosa para estudiar alteraciones sutiles en el movimiento de espermatozoides que pueden ser de interés para el estudio de la movilidad en diferentes medios así como el mejoramiento de las condiciones de criopreservación. En nuestro caso, utilizamos la movilidad subjetiva como un valor de referencia para calibrar el parámetro MOT. La buena correlación encontrada entre estos dos parámetros indica que el valor del parámetro velocidad mínima del espermatozoide para ser considerado móvil, usado para calcular MOT, es apropiado para todo el rango de movilidad.

Los resultados obtenidos, además, demuestran que el congelamiento y descongelamiento, en espermatozoides de carnero, afecta principalmente la linealidad de los trayectos realizados por los espermatozoides. En una menor medida, la VSL (como consecuencia del descenso en la LIN) y la VCL también se ven afectadas. Estos efectos observados en la velocidad de los espermatozoides están de acuerdo a los encontrados previamente en espermatozoides de mono (Tollner y col., 1990), humanos (Keel y col., 1987; Centola y col., 1992), equinos (Blach y col., 1989) y de búfalo (Rasul y col, 2001). Por otra parte, al considerar otros parámetros, parecería existir diferencias entre especies. Así, el congelamiento y descongelamiento lleva a un aumento en la linealidad de los espermatozoides humanos (Keel y col., 1987), mientras que lo opuesto ocurre en espermatozoides de mono (Tollner y col., 1990) y en espermatozoides de carnero, como se muestra en estos resultados. Recientemente, Warnke y col. (2003) informaron que el congelamiento/descongelamiento de semen equino afecta principalmente la VCL y VSL de los espermatozoides.

La explicación más aceptable para el descenso en la linealidad podría ser que el congelamiento y descongelamiento resulten en un deterioro de la estructura flagelar. Alternativamente, el daño celular podría resultar en una capacitación y reacción acrosómica prematura (Okada y col., 2001; Ikeda y col., 2002; Schembri y col., 2002; Neild y col., 2003), con un cambio de su típico patrón de movimiento (Drobnis y col., 1991; Thurston y col., 2001). Sin embargo, este hecho no se condice con la falta de cambio en la ALH observada en nuestro caso.

Por otra parte, las alteraciones en los parámetros cinéticos provocados por el congelamiento y descongelamiento podrían relacionarse con los bajos porcentajes de éxito obtenidos cuando se usa semen congelado-descongelado para inseminación cervical en ovejas, en donde es ampliamente aceptado que, durante las etapas iniciales de la fecundación, se requieren altos porcentajes de movilidad y linealidad (Shannon, 1978; Colas, 1984; Evans y Maxwell, 1987).

De este modo, se logró a poner a punto la calibración del sistema CellTrak/S<sup>TM</sup> para muestras de semen de carnero, el que será utilizado de ahora en adelante para determinar el porcentaje de espermatozoides móviles de las muestras de semen utilizadas en los restantes ensayos que constituyen esta Tesis.

## **5. CAPITULO II: Puesta a punto de una técnica de determinación del daño de membrana (integridad o viabilidad) en espermatozoides de carnero utilizando el diacetato de 6-carboxifluoresceína y el yoduro de propidio como fluorocromos**

### **5.1 INTRODUCCION**

El desarrollo de metodologías para la determinación del estado del espermatozoide es importante en la investigación de la función espermática. El establecimiento de la competencia o viabilidad de muestras de semen resulta, además, de un interés primordial para el control de nuevas tecnologías aplicadas en reproducción.

Por este motivo, el desconocimiento del estado de una muestra de espermatozoides cuando se le aplica un tratamiento o se somete a una incubación en diferentes medios durante un determinado período de tiempo, puede llevar a conclusiones erróneas con respecto a los tratamientos aplicados. Para evitar estos inconvenientes, se han desarrollado diversas técnicas que intentan cuantificar distintos parámetros que nos hablan del estado del espermatozoide en un momento determinado. En este sentido, se sabe que la viabilidad es dependiente de la integridad de la membrana plasmática (Garner y col., 1986) y de actividades biosintéticas complejas (Lindemann y Kanous, 1989; Majumder y col., 1990).

Un parámetro ampliamente difundido que refleja la viabilidad es la movilidad de la población de espermatozoides en cuestión, ya que un requerimiento básico para la penetración de las envolturas del oocito por el espermatozoide es una movilidad activa (Fraser, 1981). Como desventaja del uso de la movilidad para evaluar viabilidad, debemos considerar la dificultad para caracterizar y cuantificar el número de células móviles e inmóviles de una muestra dada, y el sabido hecho de que una porción de los espermatozoides inmóviles se encuentran viables.

Tradicionalmente, la determinación del estado del espermatozoide se realizaba por estimación visual de la movilidad en microscopio óptico. La eficiencia de esta técnica está en relación directa con la experiencia y habilidad natural del operador, y los datos obtenidos pueden no ser comparables con los obtenidos por otro observador (Dunphy y col., 1989; Malmgren, 1997).

Para superar este inconveniente, se han desarrollado una serie de metodologías tendientes a evaluar la viabilidad independientemente de la movilidad. Dentro de ellas, la determinación de la integridad de membrana ha sido ampliamente estudiada y aceptada.

En los primeros estudios se utilizaron técnicas que evaluaban la integridad estructural de la membrana plasmática y el acrosoma con combinaciones de colorantes vitales como la eosina-nigrosina (Hancock, 1951; Blom, 1968), eosina-anilina azul (Shaffer y Almquist, 1948), eosina-azul ópalo (Nour el-Din y col., 1969), naftol amarillo-eritrosina B (Bryan y Akruk, 1977) o el fast green-eosina (Meyhofer, 1965). Luego se adicionaron la técnica conocida como tinción triple (Triple Stain en inglés), que utiliza como colorantes el azul tripan en combinación con el marrón de Bismark y rosa de Bengala (Talbot y Chacón, 1981) y la combinación de eosina-nigrosina junto con Giemsa (Tamuli y Watson, 1994). Otro tipo de tinción utilizada desde tiempo atrás y que evalúa la morfología nuclear es la tinción de Feulgen (Feulgen y Rossenbeck, 1924; Kasten, 1964).

Con el advenimiento del uso del microscopio de fluorescencia, se iniciaron los estudios de una variedad de fluorocromos para su aplicación en espermatología (Van Demark y col., 1959), pero el costo del equipamiento hizo que sólo recientemente estas técnicas fueran perfeccionadas y su empleo se hiciera extensivo. En una primera etapa, se utilizaron distintos fluorocromos para la tinción y el reconocimiento del daño de la membrana nuclear de los espermatozoides como indicador de viabilidad, como el yoduro de propidio (Vasquez y col., 1990); el bromuro de etidio (Jeulín y col., 1982); el 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Woelders y col., 1992); la anexina V (Januskauskas y col., 2003), el Hoechst 33342 (Evenson y col., 1982) y el Hoeschst 33258 (Cross y col., 1986). Actualmente se han desarrollado una serie de técnicas que combinan el uso de dos fluorocromos, de los cuales uno tiñe diferencialmente el citoplasma celular y permite identificar el daño en la membrana plasmática, y el otro tiñe el ADN, y permite reconocer el daño de la membrana nuclear (Garner y col., 1986; Althouse y Hopkins, 1995; Pena y col., 1999).

Además de estas técnicas que evalúan la integridad estructural de las membranas, se ha desarrollado una técnica que analiza la integridad funcional de la membrana cuando ésta se pone en contacto con una solución salina hipotónica. Esta técnica se conoce con el nombre de test hipoosmótico (HOS o HOST) (Jeyendran y col., 1984).

En nuestro caso, se propuso el uso de la técnica que involucra al diacetato de 6-carboxifluoresceína en combinación con yoduro de propidio, como metodología para determinar la viabilidad o integridad de membrana, para su posterior aplicación en todos los ensayos que requieran conocer el estado de muestras de semen incubadas o tratadas. Esta tinción doble se basa en que el yoduro de propidio se une y tiñe el ADN celular, pero es impermeable a la membrana plasmática, de modo que sólo puede atravesarla si la membrana está dañada. El diacetato de 6-carboxifluoresceína por su parte, es permeable a la membrana y una vez en el interior de la célula, si ésta se encuentra intacta, es atacado por esterases no específicas presentes en el citoplasma que rompen los enlaces acetato, y liberan la carboxifluoresceína libre, que no permea la membrana plasmática. De esta manera, si la membrana celular estaba intacta, aparece la tinción verde fluorescente en todo el citoplasma celular (Garner y col., 1986; Harrison y Vickers, 1990).

En este capítulo, se presentan los resultados de la puesta a punto de la técnica de determinación del daño de membrana (integridad o viabilidad) en espermatozoides de carnero utilizando estos fluorocromos, así como la comparación de los resultados obtenidos por esta técnica respecto a la movilidad de los espermatozoides y a otra técnica conocida (fast green), tanto para espermatozoides frescos como enfriados hasta 4°C y congelados/descongelados, e incubados durante 8 horas a 37°C.

## **5.2. METODOS**

### **5.2.1. Colección de semen y su procesamiento**

El semen fue colectado, evaluado y procesado. Cuando la muestra se procesó en fresco, ésta se diluyó hasta una concentración de  $500 \times 10^6$  espermatozoides/ml en el Diluyente 2 de congelamiento (Ver Apéndice) y se utilizó inmediatamente para la determinación de los parámetros cinéticos. Una fracción de la muestra fue enfriada hasta 4°C para evaluación de la viabilidad. Otra parte se congeló y descongeló para su posterior análisis. Las muestras utilizadas también se procesaron para el test de termorresistencia. Todos los procedimientos realizados se describen en Materiales y Métodos Generales y en el Capítulo I de esta Tesis.



### **5.2.2. Determinación de la integridad de membrana por el uso de diacetato de 6-carboxifluoresceína y yoduro de propidio**

La muestra de semen fue colocada en el extremo superior de 1 ml de solución de Ficoll 400 (Apéndice), y centrifugada a 15.600xg durante 30 segundos en una Microcentrífuga Eppendorf Modelo 5414. Los espermatozoides sedimentados fueron suspendidos en 400 µl de citrato de sodio 3% (v/v). Alícuotas de 100 µl de estos espermatozoides fueron adicionadas a 400 µl de solución de trabajo de fluorocromos (Apéndice). Las incubaciones fueron realizadas durante 12 minutos en baño térmico a 30°C en la oscuridad. Alícuotas de 20µl se colocaron sobre portaobjetos de vidrio y se cubrieron con cubreobjeto. Las muestras se observaron en un microscopio Nikon Optiphot de epifluorescencia, utilizando los filtros B-2A y G-2A para la carboxifluoresceína y el yoduro de propidio, respectivamente. Se contaron por lo menos 200 células por duplicado para cada muestra. En estas condiciones, los espermatozoides con membrana intacta se tiñen de verde, mientras que los que presentan la membrana dañada aparecen rojos (Figura 1).

### **5.2.3. Determinación de la viabilidad por el uso de fast-green**

Alícuotas de 50 µl de semen fresco o congelado/descongelado se diluyeron hasta una concentración final de  $5 \times 10^8$  espermatozoides/ml con citrato de sodio al 3% y se les agregó 100 µl de una solución conteniendo fast green 2% (p/v) y 0,4% (p/v) de eosina B en buffer fosfato. Después de mezclarlos, se tomó una gota de esta preparación y se colocó entre porta y cubreobjetos y se observó en microscopio de luz común. Se contaron un mínimo de 200 espermatozoides para cada muestra por duplicado.

### **5.2.4. Análisis estadísticos**

Los datos fueron analizados utilizando un test Anova Kruskal-Wallis, utilizando el paquete estadístico CSS:Statistica™ Module, StatSoft Inc, Tulsa, OK, USA.

## **5.3. RESULTADOS**

La Figura 1 muestra el patrón de marcación de los espermatozoides de carnero con membrana plasmática intacta (viables) y aquellos que presentan la membrana

plasmática dañada (no viables). La marcación de los primeros es verde en toda la cabeza del espermatozoide, mientras que la de los dañados es roja. Nótese que algunos espermatozoides poseen la membrana plasmática dañada pero la membrana acrosómica intacta. Son aquellos en los que se observa el acrosoma de color verde contenido en una cabeza de color rojo. En la figura se pone de manifiesto claramente que la diferenciación entre espermatozoides intactos y dañados por esta metodología es tal que no permite confusión alguna en su identificación.

La Tabla I muestra los cambios en los porcentajes de movilidad e integridad de membrana durante la incubación de las muestras de semen eyaculado durante 8 horas a 37°C. Inmediatamente después de la dilución, el porcentaje de espermatozoides intactos fue más bajo que el de células móviles, sugiriendo la presencia de una subpoblación de espermatozoides con la membrana dañada, pero móviles. La movilidad se redujo progresivamente a lo largo de la incubación, desde un valor inicial de 70-80% a 40-45% después de 8 horas. En contraste, el porcentaje de células viables por la técnica de fast green fue más alto que el de células móviles y se mantuvo esencialmente constante a lo largo de la incubación, indicando que este método no es muy exacto para medir la viabilidad del espermatozoide durante una incubación *in vitro*.

Tiempo de incubación	0 horas	4 horas	8 horas
CFDA-PI (%)	61,6 ± 10,0	56,7 ± 12,1	52,2 ± 9,8
Fast Green (%)	76,9 ± 7,2	76,3 ± 7,4	74,3 ± 8,3
Movilidad (%)	71,7 ± 3,3	64,0 ± 3,5 *	43,4 ± 11,4 *

Tabla I. Porcentaje de espermatozoides móviles e integridad de membrana durante la incubación de espermatozoides frescos de carnero a 37°C. Los valores representan Media ± DS (n=18). \* p<0,001 vs 0 horas.

Como se muestra en la Tabla II, la integridad de membrana es mantenida después del enfriamiento lento hasta 4°C. A pesar de ello, el congelamiento y descongelamiento resultaron en una reducción del 70% en el porcentaje de espermatozoides con membrana intacta. De acuerdo con ello, sólo un 15% de los espermatozoides mantienen sus membranas intactas después del descongelamiento, en comparación con los valores normalmente encontrados en espermatozoides frescos, no congelados (55-60%). En

contraste, la movilidad se redujo del 74% en semen fresco a 41% en semen descongelado.

	Fresco	Enfriado	Congelado/Descongelado
Integridad de membrana (%)	56,3 ± 8,9	53,6 ± 9,5	16,3 ± 4,1 **
Movilidad (%)	73,2 ± 3,6	68,4 ± 3,6 *	40,7 ± 15,4 **

Tabla II. Porcentaje de movilidad e integridad de membrana en espermatozoides frescos, enfriados y descongelados. Se representa la Media ± DS (n=12). \* p<0,01, \*\* p<0,001 vs valores de muestras frescas.

La medición de la integridad de membrana involucra el uso de formaldehído a una concentración lo suficientemente baja como para inmovilizar al espermatozoide mientras mantiene intacta la integridad de su membrana. Asimismo, podría ocurrir que la sensibilidad de la membrana del espermatozoide al formaldehído fuera diferente en espermatozoides frescos y descongelados. Para examinar esta posibilidad, se utilizaron muestras de espermatozoides descongelados y se incubaron con la tinción de fluorocromos que contenía o no formaldehído. En este último caso, los preparados se midieron inmediatamente después de realizados para permitir un mejor conteo. Los valores Medios del porcentaje de espermatozoides intactos (n=77) fueron 14,1 ± 6,8 y 15,2 ± 7,4 en presencia o no de formaldehído, respectivamente, eliminando así la posibilidad de un efecto deletéreo del formaldehído sobre la integridad de membrana en esta concentración utilizada.

El efecto del congelamiento y descongelamiento sobre los espermatozoides durante un test de termorresistencia de 8 horas de incubación se muestra en la Tabla III. Inmediatamente después del descongelamiento, un 40% de los espermatozoides muestran movilidad progresiva, mientras que sólo un 17% muestra membrana intacta según lo medido por el uso de los fluorocromos. Adicionalmente, después de 8 horas de incubación a 37°C, la movilidad se redujo a un 10-15%, comparable con el porcentaje de espermatozoides con membrana intacta, que se mantienen aproximadamente igual durante toda la incubación. El porcentaje de viables, según los resultados obtenidos por el uso del fast green, fueron más altos que el porcentaje de movilidad y se mantuvieron más altos a lo largo de las 8 horas de incubación.

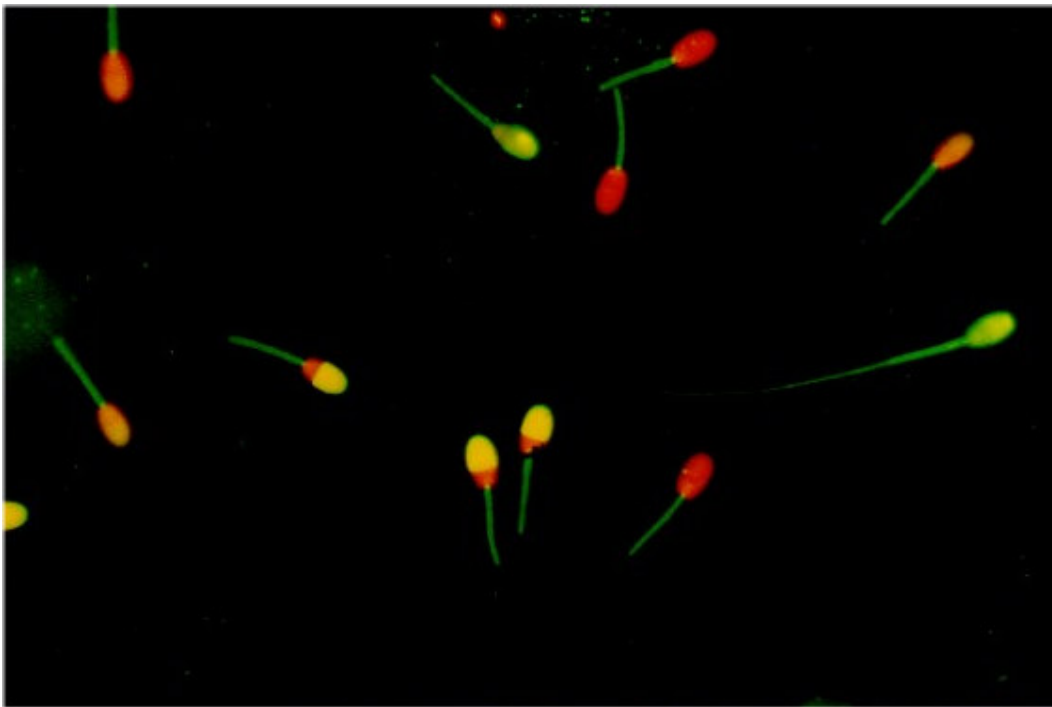


Figura 1. Muestra de espermatozoides de carnero descongelados luego de la tinción con diacetato de 6-carboxifluoresceína y yoduro de propidio. Se observa el patrón de marcación de los espermatozoides de carnero con membrana plasmática intacta (viables) y aquellos que presentan la membrana plasmática dañada (no viables).

Tiempo de incubación	0 horas	4 horas	8 horas
CFDA-PI (%)	16,8 ± 6,6	12,9 ± 7,2	13,7 ± 6,4
Fast Green (%)	45,7 ± 11,1	39,4 ± 9,6	35,6 ± 12,0 *
Movilidad (%)	39,3 ± 2,9	29,7 ± 6,1 **	9,8 ± 9,0 **

Tabla III. Porcentaje de movilidad e integridad de membrana durante la incubación de espermatozoides de carnero descongelados y mantenidos a 37°C. \* p<0,01, \*\* p<0,001 vs 0 horas.

#### 5.4 DISCUSION

Los resultados aquí presentados demuestran la utilidad de la metodología que involucra el uso de dos fluorocromos (acetato de 6-carboxifluoresceína y yoduro de propidio) para la determinación de la integridad de membrana de espermatozoides de carnero tanto frescos, como enfriados o congelados/descongelados. Los estudios utilizando espermatozoides frescos mostraron que algunos espermatozoides aunque móviles, exhibieron daño en la membrana, posiblemente debido al envejecimiento, al efecto de los cambios térmicos y mecánicos sufridos durante la colección de las muestras como al procesamiento de las mismas. Estos resultados coinciden con los observados por Maxwell y col. (1997) para espermatozoides de bovinos y carnero y por Salamon y Maxwell (1995) quienes sugirieron que la movilidad espermática de los espermatozoides ovinos crioconservados es habitualmente mayor que la integridad morfológica de sus acrosomas. De acuerdo con este concepto, aquellos espermatozoides podrían no ser funcionales (Centola y col., 1990). Recientemente, Reyes y col. (2002) propusieron que el daño de la integridad de la membrana no significa necesariamente que ese espermatozoide sea inviable, sino que se encuentre alterado. De este modo parecería entonces ser que la evaluación de la integridad de la membrana podría ser más precisa que la determinación de la movilidad para determinar la calidad de una muestra de semen (Fraser y col., 2001). El hecho de que la movilidad esté marcadamente reducida durante la incubación a 37°C, mientras que la integridad de membrana es mantenida, sugiere la existencia de un factor o factores que llevan a la inmovilización del espermatozoide, no relacionados necesariamente con la pérdida de la viabilidad.

De nuestros resultados se desprende también que el diacetato de 6-carboxifluoresceína tiene diferencias en la capacidad para identificar células viables con respecto al colorante vital fast green. Esto se pone de manifiesto en todos los ensayos analizados y que forman parte de este capítulo, indicando que la carboxifluoresceína tiene una mayor sensibilidad que el fast green para identificar las células estructuralmente intactas. Esto está de acuerdo con lo observado por Pintado y col. (2000) para espermatozoides de cerdo y toro, en los que demostraron que existen diferencias en la capacidad de los colorantes tanto fluorescentes como vitales (yoduro de propidio, Hoechst 33258 y eosina) en detectar los espermatozoides no viables. Esta situación entonces, debe ser tenida en cuenta cuando uno realiza ensayos en los que la determinación de la viabilidad celular acompaña a la evaluación de otros parámetros espermáticos.

Es claro que la integridad de la membrana se reduce drásticamente después del descongelamiento, mientras que el efecto sobre la movilidad no es tan evidente. Además, el análisis simultáneo de la integridad de la membrana y la movilidad reveló la existencia de una vasta población de espermatozoides dañados que eran móviles inmediatamente después del descongelamiento. Uno entonces puede predecir que estos espermatozoides van a perder su movilidad dentro de las primeras horas de incubación a 37°C, y este parece ser el caso, como se ve en la Tabla III. Debido a que la integridad de membrana permanece constante durante la incubación, estos resultados sugieren fuertemente que el daño de membrana es el mayor responsable de la baja supervivencia de los espermatozoides descongelados e incubados a 37°C.

En conclusión, la evaluación de la integridad de membrana por medio de fluorocromos mostró ser un marcador preciso y muy sensible de la viabilidad de los espermatozoides de carnero. Por otra parte, sugerimos que este método puede ser utilizado para evaluar la eficiencia de los procedimientos de criopreservación así como la evaluación de la integridad de membrana en muestras en las cuales se requiera conocer la viabilidad de espermatozoides sujetos a otro tipo de ensayos, como los correspondientes a capacitación.

Como se describió en este capítulo, se logró a poner a punto una técnica para la evaluación de la integridad de membrana de los espermatozoides de carnero por medio de fluorocromos. Esta técnica será utilizada de ahora en adelante para determinar la

viabilidad de los espermatozoides de carnero en los restantes ensayos que constituyen esta Tesis.

## **6. CAPITULO III: Puesta a punto de una técnica de determinación del daño de la membrana acrosomal en espermatozoides viables de carnero utilizando simultáneamente lectinas marcadas con fluorocromo y el colorante Hoechst 33258.**

### **6.1. INTRODUCCION**

Un aspecto importante en la evaluación de la calidad del semen es la determinación de la capacidad de los espermatozoides para sufrir la reacción acrosómica. Este proceso está asociado a la activación y pérdida exocitótica de enzimas proteolíticas del acrosoma y se considera que tiene un papel importante en la penetración de las envolturas del oocito (revisado por Yanagimachi, 1994). En espermatozoides de carnero, muchas veces es difícil monitorear el estado acrosomal por microscopía con luz convencional (Shams-Borhan y Harrison, 1981; Watson y col., 1991; Tamuli y Watson, 1994), por otro lado, la microscopía electrónica (Ben-Av y col., 1988; Shams-Borhan y Harrison, 1981; Watson y col., 1991; Williams y col., 1991) no es práctica para propósitos rutinarios. Diversos métodos han sido descritos para evaluar el porcentaje de espermatozoides con acrosoma reaccionado. Dentro de ellos incluimos la tinción con colorante Giemsa (Watson y Martin, 1972), la tinción triple (Gutierrez y col., 1993), la tinción con naftol amarillo/eritrosina B (Graham y col., 1987; Williams y col., 1991; Maxwell y col., 1995), con eosina-nigrosina (Thompson y Cummins, 1985; Tamuli y Watson, 1994) y con azul de tripán/giemsa (Didion y col., 1989). Otras alternativas para evaluar el estado acrosomal son el estudio de la cantidad de glicoproteínas liberadas por un ensayo del tipo ELISA (Margalit y col., 1997) y métodos enzimáticos (Williams y col., 1991).

En otras especies, para establecer el daño acrosomal, se utilizaron la tinción de Wells-Awa (Wells y Awa, 1970), la tinción denominada Spermac (Oettle, 1986; Paulenz y col., 1995), distintos anticuerpos (Byrd y Wolf, 1986; Ballard y col., 1987, 1988; Jones y col., 1990; Carver-Ward y col., 1994; Cohen-Dayag y Eisenbach, 1994; Peknikova y Moss, 1998; Palecek y col., 1999), la albúmina sérica bovina manosilada (MAF, Amin y col., 1996), la quinacrina (Amin y col., 1996), el amarillo naftol junto con anilina azul



(Christensen y col., 1994), la tinción con azul coomassie G-250 (Moller y col., 1990; Larson y Miller, 1999), fuclectinas (D`Cruz y Haas, 1996) y el ensayo de Acrobeads (Centola y col., 1997). Way y col. (1995) combinaron el fast green con eosina B, la eosina B con anilina azul, el azul tripan con Giemsa y el amarillo naftol con eritrosina B en espermatozoides de bovinos. Por diferentes razones, estas técnicas no han sido ampliamente utilizadas. De todos modos, ninguna de estas técnicas por si sola brinda información sobre si la pérdida del acrosoma fue fisiológica o degenerativa (Christensen y col., 1994).

Las lectinas conjugadas con fluoresceína están siendo usadas con mayor asiduidad para la determinación del estado acrosomal. En particular, las aglutininas del *Pisum sativum* (PSA), *Arachis hypogea* (PNA) y *Triticum vulgare* (WGA) han sido utilizadas extensamente (Mortiner y col., 1987; Aitken y Brindle, 1993; Bawa y col., 1993; Calvo y col., 1993; Brucker y col., 1994; Cross y Watson, 1994; Cheng y col., 1996; Mattioli y col., 1998; Katayama y col., 2002) .

El uso de tinciones dobles para la determinación simultánea del estado acrosomal y la integridad de la membrana ofrece información adicional sobre aquellos espermatozoides que son potencialmente fértiles. Las tinciones supravitales fluorescentes tales como el Hoechst 33258 y el yoduro de propidio (sólo o combinado con diacetato de 6-carboxifluoresceína), han sido de gran utilidad para la determinación de la integridad de membrana espermática (Cross y col., 1986; Garner y col., 1986; Harrison y Vickers, 1990; Mendoza y col., 1992; Kay y col., 1994). Varios autores (Holden y col., 1990; Holden y Trounson, 1992; Ozaki y col., 2002) utilizaron en espermatozoides humanos la combinación de concanavalina A fluoresceinada (FITC-ConA) y Hoeschst 33258 para la determinación simultánea de reacción acrosómica y viabilidad, y Marti y col. (2000) utilizaron la aglutinina del *Ricinus communis* fluoresceinada (FITC-RCA) junto con la CFDA/PI para espermatozoides de carnero. Para espermatozoides humanos, Aitken y col. (1993) utilizaron la combinación de lectinas/HOS, Tao y col. (1993) la combinación de anticuerpos monoclonales fluoresceinados y Hoeschst 33258, mientras que Viggiano y col. (1996) utilizaron la combinación HOS/Spermac.

En este capítulo, presentamos la puesta a punto de una técnica de determinación simultánea del daño acrosomal y de la membrana plasmática en espermatozoides de carnero tanto frescos como congelados/descongelados, y luego de la incubación de los

mismos con un inductor de la reacción acrosómica a distintos tiempos, utilizando para ello lectinas fluoresceinadas y el colorante Hoechst 33258. Esta técnica doble fue previamente utilizada para espermatozoides equinos por Casey y col. (1993), por Tao y col. (1993) en espermatozoides de ratón, por Hinsch y col. (1997) en espermatozoides de bovinos, y de humanos por Ozaki y col. (2002).

## **6.2. METODOS**

### **6.2.1 Determinación simultánea del patrón de unión de lectinas y la integridad de membrana**

Alícuotas de 10 µl de semen puro, conteniendo  $4-5 \times 10^7$  espermatozoides, fueron diluídas en 90 µl de citrato de sodio 3% (m/v), mezcladas con 100 µl de una solución de Hoechst 33258 (1 µg/ml en citrato de sodio) e incubadas en baño térmico a 37°C durante 3 minutos. El exceso del colorante fue removido por centrifugación sobre un colchón de Ficoll 400 a 15.600xg durante 30 segundos. El sobrenadante fue cuidadosamente aspirado y descartado. El sedimento fue resuspendido en 400 µl de PBS y centrifugado nuevamente, y el sedimento obtenido fue resuspendido y fijado en etanol 95% a 4°C durante 10 minutos. Luego de este período, se centrifugó a 15.600xg durante 30 segundos, se descartó el sobrenadante, se resuspendió el sedimento en 2 ml de PBS y se lavó por centrifugación en las condiciones descriptas anteriormente, para descartar el sobrenadante y el sedimento ser finalmente resuspendido en 90 µl de PBS. Para la marcación con las lectinas, se utilizaron 10 µl de una solución que contenía 100 µg/ml de cada una de las lectinas en PBS. La solución fue incubada en baño térmico a 37°C y en oscuridad durante 8 minutos. Luego se lavó por centrifugación con 1 ml de PBS para extraer el exceso de lectina, y el precipitado se resuspendió en 50 µl de una solución de montaje consistente en 90% (v/v) de glicerol en PBS. Se tomó una alícuota de esta suspensión y se montó en portaobjetos de baja fluorescencia, se cubrió con cubreobjeto y se observaron al menos 200 espermatozoides por portaobjeto, por duplicado, en un microscopio Nikon Optiphot de epifluorescencia, utilizando los filtros UV y B-2A para el Hoechst y las lectinas, respectivamente.

### **6.2.2. Inducción de la exocitosis acrosomal por el uso de ionóforo de calcio A23187**

Alícuotas de 10  $\mu$ l ( $4-5 \times 10^7$  espermatozoides) de semen puro fueron diluídas 1:10 en PBS, mezcladas con un volumen igual de solución de ionóforo A23187 en PBS (preparado a partir de una solución madre 5 mM en dimetilsulfóxido (DMSO)), hasta llevarlo a una concentración final de 5  $\mu$ M de A23187 y 0,1% (v/v) DMSO. Las muestras fueron incubadas en estufa a 38,5°C en una atmósfera humidificada de 5 % de CO<sub>2</sub> en aire. Las muestras control contenían espermatozoides incubados sólo con 0,1 % de DMSO.

Después de 30 y 60 minutos de incubación en A23187, se tomaron alícuotas para la determinación de la exocitosis acrosomal por el ensayo de unión de lectinas e integridad de membrana simultáneamente, y por microscopía de contraste diferencial de interferencia (DIC).

### **6.2.3. Especificidad de la unión de lectinas**

La especificidad de las lectinas se determinó por su competencia respectiva con diferentes monosacáridos. Así, las soluciones stock de las distintas lectinas fueron mezcladas con volúmenes iguales de  $\alpha$ -metilmanosido, D-galactosa o N-acetil-D-glucosamina; todas ellas en concentración 1M. Luego de 30 minutos de incubación, se realizaron los ensayos de marcación sobre espermatozoides.

### **6.2.4. Determinación del estado acrosomal por el uso de microscopio de contraste de interferencia diferencial (DIC)**

Adicionalmente, la morfología acrosomal fue determinada utilizando un microscopio de contraste de interferencia diferencial, de acuerdo a la metodología y patrones morfológicos descritos por Watson y col. (1991), con la excepción de que los estadios tardíos e intermedios fueron considerados como un único estadio. Para este propósito, se contaron como mínimo 100 espermatozoides por portaobjetos por duplicado.

### **6.2.5. Análisis estadísticos**

Los resultados obtenidos fueron analizados utilizando un test t de Student o bien un ANOVA con test de Tukey, luego de la transformación angular de los porcentajes

obtenidos. La correlación fue determinada utilizando un análisis de regresión lineal (Steel y Torrie, 1981).

### **6.3. RESULTADOS**

Para esta puesta a punto, comparamos la capacidad de tres lectinas para caracterizar la integridad acrosomal de los espermatozoides de carnero. Las Figuras 1, 2 y 3 muestran los patrones de marcación de la PSA, PNA y WGA respectivamente. Tanto para la PSA como para la PNA, la forma más abundantemente encontrada en el semen fresco fue la que presentaba marcación fluorescente en el área acrosomal. Esta forma corresponde a espermatozoides con el acrosoma intacto, según lo reveló la observación con DIC. También se encontraron dos formas menores, una de ellas mostró una débil fluorescencia en el segmento ecuatorial de la cabeza y la otra no mostró marcación fluorescente en la cabeza (Figuras 1 y 2). La observación con DIC reveló que ambas formas correspondían a espermatozoides que habían sufrido la pérdida completa del acrosoma.

La marcación con la lectina WGA mostró dos patrones de marcación diferentes (Figura 3). Uno de ellos presentó marcación fluorescente en la totalidad de la cabeza del espermatozoide, aunque más intensamente marcado en la región anterior. Estos espermatozoides resultaron tener el acrosoma intacto según DIC. El otro patrón de marcación carecía de fluorescencia en la región acrosomal, pero presentó una marcación débil en el resto de la cabeza. Esta forma correspondió a espermatozoides que habían perdido el acrosoma según lo reveló la observación con DIC.

Por otra parte, algunos espermatozoides mostraron daño parcial del acrosoma, que se puede identificar claramente independientemente de la lectina utilizada y que se muestra en las Figuras 1, 2 y 3.

Los espermatozoides con daño de membrana se caracterizaron por presentar patrones de marcación de lectinas anómalos: a) marcación en forma de "parches" o puntiforme en el acrosoma, marcación completa del acrosoma y marcación en el segmento ecuatorial y post-ecuatorial cuando se utilizó la PSA como lectina; b) marcación en forma de "parches" o puntiforme en el acrosoma con la lectina PNA; y c) marcación completa o puntiforme exclusivamente en el acrosoma, marcación en el segmento ecuatorial exclusivamente, y ausencia completa de marcación en toda la cabeza del

espermatozoide cuando la lectina involucrada era la WGA. En todos los casos, entre un 10-15% de los espermatozoides no viables según la marcación con Hoechst 33258 presentaron acrosomas intactos, y un 45-50% de estos presentaron pérdida del acrosoma, según lo determinado por DIC. Para los ensayos posteriores, sólo se consideraron los espermatozoides intactos (viables).

La marcación con PSA no se detectó cuando se realizó la preincubación de esta lectina con  $\alpha$ -metilmanósido 1M, mientras que la D-galactosa y la N-acetil-D-glucosamina no tuvieron efecto sobre la marcación. Del mismo modo, la marcación con PNA y WGA fue inhibida sólo en presencia de D-galactosa y N-acetil-D-glucosamina, respectivamente.

Las tres lectinas utilizadas identificaron la pérdida del acrosoma luego de la incubación de los espermatozoides con A23187 5  $\mu$ M, conocido inductor de la exocitosis acrosomal (Tabla I).

Lectina	Tiempo (minutos)		
	0	30	60
PSA (%)	2 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	42 $\pm$ 3 <sup>b</sup>	66 $\pm$ 4 <sup>c</sup>
PNA (%)	1 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	38 $\pm$ 3 <sup>b</sup>	60 $\pm$ 4 <sup>c</sup>
WGA (%)	2 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	36 $\pm$ 4 <sup>b</sup>	66 $\pm$ 5 <sup>c</sup>

Tabla I. Porcentaje de espermatozoides con pérdida del acrosoma después de la incubación con A23187, según lo evaluado por el uso de PSA, PNA y WGA. Los valores representan Media  $\pm$  DS (n=12). Los valores con subíndices distintos, difieren significativamente (P<0,001).

Esto fue confirmado por la acumulación de estas formas dependiente del tiempo, así como por el uso de DIC. Para todos los tiempos, las diferencias encontradas entre los valores obtenidos usando cualquiera de las tres lectinas no fueron significativas (p > 0,05).

El análisis de regresión lineal indicó una fuerte correlación entre la capacidad para detectar la reacción acrosómica por parte de las tres lectinas utilizadas (Tabla II).

Comparación	r <sup>2</sup>	P
PSA vs PNA	0,91	<0,0001
PSA vs WGA	0,92	<0,0001
PNA vs WGA	0,92	<0,0001

Tabla II. Análisis de regresión lineal entre los valores obtenidos para las lectinas PSA, PNA y WGA. n=42 para cada comparación

La Tabla III muestra el efecto de la criopreservación sobre el porcentaje de espermatozoides con el acrosoma intacto dentro del total de la población (espermatozoides dañados e intactos) y sobre el porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto dentro de la población con membrana intacta. Es claro que el congelamiento y descongelamiento lleva a un descenso tanto de la integridad de membrana como de la integridad acrosomal, independientemente de la lectina utilizada. De todos modos, casi todos los espermatozoides que sobreviven a la criopreservación, según lo evaluado por la tinción con Hoechst, muestran acrosomas intactos. En este caso, no se encontraron diferencias significativas entre muestras de semen fresco y congelado/descongelado (Tabla III).

	PSA		PNA		WGA	
	Fresco	Cong/Desc	Fresco	Cong/Desc	Fresco	Cong/Desc
% de acrosoma intacto del total de la población	72 ± 4 <sup>a</sup>	43 ± 10 <sup>b</sup>	70 ± 6 <sup>a</sup>	42 ± 10 <sup>b</sup>	69 ± 6 <sup>a</sup>	42 ± 10 <sup>b</sup>
% de acrosoma intacto de la población con membrana plasmática intacta	98 ± 1	96 ± 2	96 ± 3	94 ± 2	95 ± 3	95 ± 2

Tabla III. Efecto del congelamiento y descongelamiento sobre la integridad de la membrana plasmática y el estado acrosomal de espermatozoides de carnero. Los valores representan Media ± DS (n=12). Los números con diferente supraíndice difieren significativamente (p<0,001). El porcentaje de integridad de membrana y motilidad fue 73 ± 4 y 73 ± 2, respectivamente, para semen fresco, y 44 ± 10 y 38 ± 5 respectivamente, para semen congelado/descongelado.

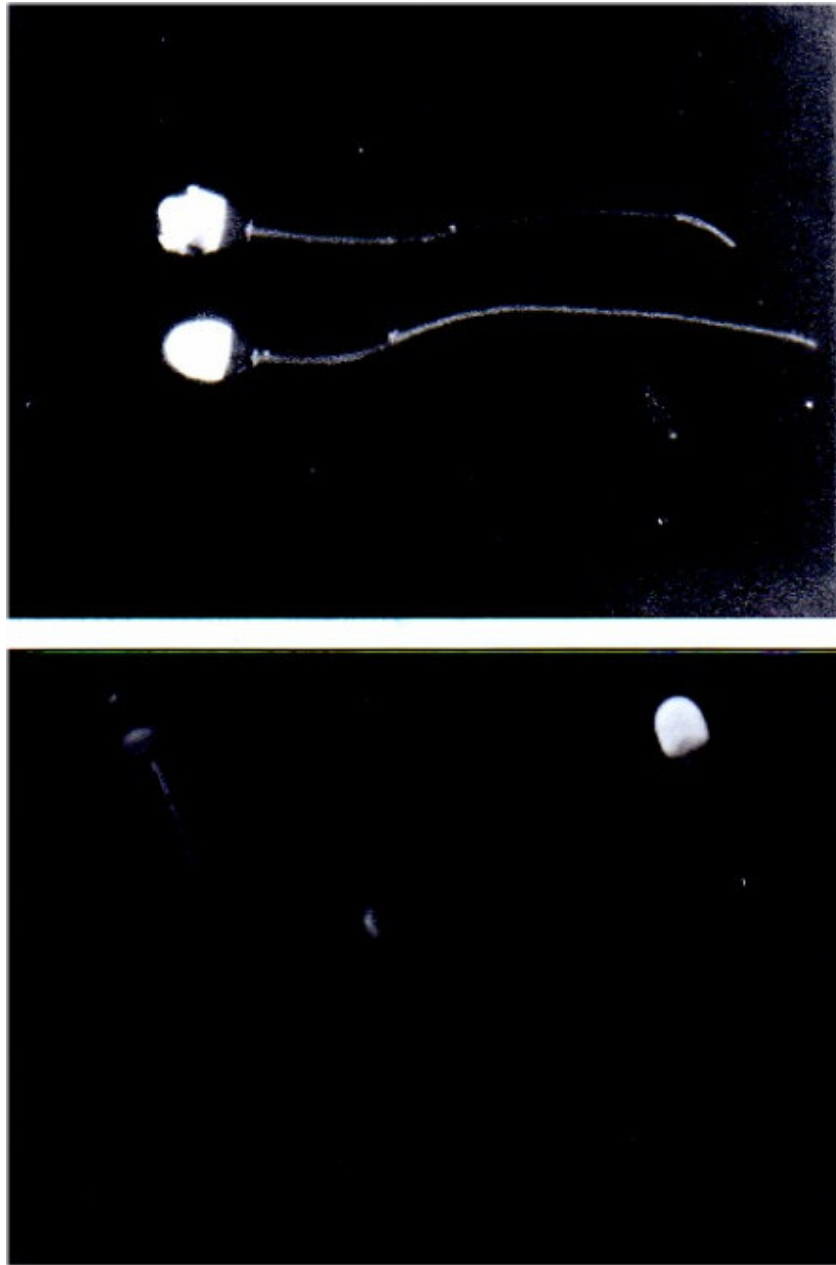


Figura 1. Patrones de marcación de la lectina PSA en espermatozoides de carnero. Foto superior: Un espermatozoide con daño parcial del acrosoma y uno con el acrosoma intacto. Foto inferior: Dos espermatozoides con una débil fluorescencia en el segmento ecuatorial de la cabeza, que corresponden a espermatozoides que han sufrido la pérdida completa del acrosoma. Un tercer espermatozoide presenta acrosoma intacto.

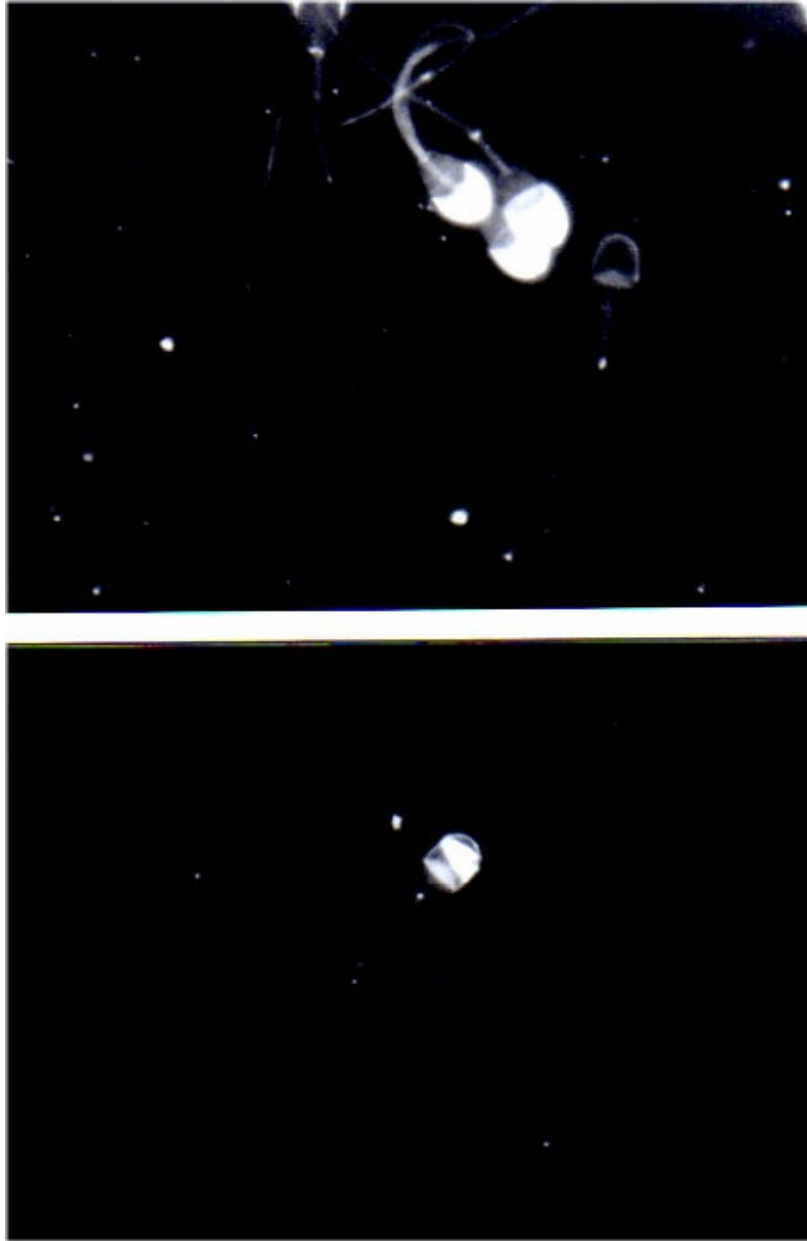


Figura 2. Patrones de marcación de la lectina PNA en espermatozoides de carnero.  
Foto superior: Tres espermatozoides con acrosoma intacto. Un cuarto espermatozoide (derecha) presenta una débil fluorescencia en el segmento ecuatorial de la cabeza, que corresponde a un espermatozoide con pérdida completa del acrosoma. Foto inferior: Espermatozoide con daño parcial del acrosoma.



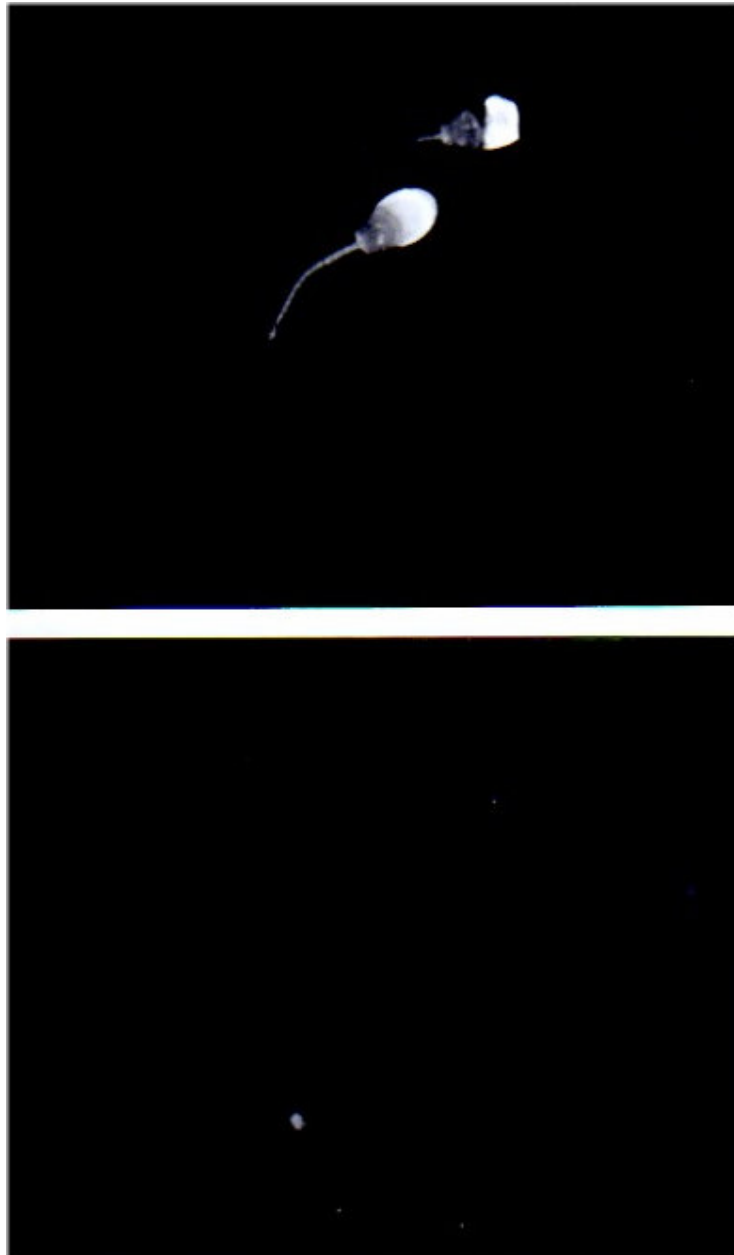


Figura 3. Patrones de marcación de la lectina WGA en espermatozoides de carnero.  
Foto superior: Un espermatozoide con daño parcial del acrosoma y uno con el acrosoma intacto. Foto inferior: Espermatozoide con una débil fluorescencia en el segmento ecuatorial y en el postacrosoma de la cabeza, que corresponde a un espermatozoides que ha sufrido la pérdida completa del acrosoma.

#### **6.4. DISCUSION**

Los resultados presentados aquí demuestran que las lectinas pueden ser efectivamente utilizadas para monitorear el estado acrosomal del espermatozoide de carnero. Adicionalmente, se desarrolló un método para la determinación simultánea de la integridad de membrana plasmática y el estado acrosomal en espermatozoides de carnero.

La tinción doble descrita aquí involucra una primera etapa en la que el daño de las células se pone de manifiesto con un fluorescente vital, seguido por una marcación con una lectina. El Hoechst 33258 es un colorante supravital ampliamente utilizado para la determinación de la integridad de membrana, debido a que en condiciones normales no penetra hacia el interior de la membrana plasmática de la célula, mientras que en caso de daño o permeabilización de la misma, penetra hacia el núcleo y se une firmemente al ADN (Visser, 1981).

Dado que la tinción con lectinas involucra una fijación con etanol, el que permeabiliza todas las células, es esencial que el exceso del fluorocromo sea perfectamente removido por lavado. En nuestras condiciones, el uso de yoduro de propidio (que es usado generalmente en combinación con acetato de carboxifluoresceína) no fue efectivo, debido a que todas las células aparecieron marcadas luego de la fijación con etanol. En cambio este efecto no se observó al utilizar Hoechst 33258. El efecto del PI ya había sido observado previamente en espermatozoides humanos (Centola y col., 1990). Una explicación posible para las diferencias entre ambos colorantes sería que el exceso de PI presente en las células podría ser suficiente como para difundir desde las células dañadas marcando las originalmente intactas, mientras que el exceso de Hoechst 33258 no lo hace. Las muestras controles mostraron que después de la tinción con Hoechst, el lavado y la permeabilización, el porcentaje de espermatozoides con membrana intacta no fue significativamente diferente del obtenido después de la tinción sola, lo que valida el procedimiento.

Utilizamos un microscopio de contraste de interferencia diferencial para monitorear el estado del acrosoma de los espermatozoides que presentaban diferentes patrones de marcación con lectinas. Tanto para la PSA como para la PNA, la forma más abundantemente encontrada en semen fresco presentó tinción en el acrosoma, mientras que aquellos espermatozoides que no presentaron marcación en esta región o aquellos que sólo la presentaron en el segmento ecuatorial fueron asociados con formas

reaccionadas. En espermatozoides no viables se encontró marcación en forma de "parches" o puntiforme.

Los patrones encontrados para la PNA coincidieron con los previamente encontrados en otras especies (Virtanen y col., 1984; Lee y Damjanov, 1985; Aitken y col., 1993; Cross y Watson, 1994; Long y col., 1996; Kitiyant y col., 2002). Este también fue el caso para la PSA (Cross y col., 1986; Fukuda y col., 1989; Centola y col., 1990; Mendoza y col., 1992; Casey y col., 1993; Kawakami y col., 1993; Tesarik y col., 1993a; Ozaki y col., 2002).

Es posible que las dos formas asociadas a la pérdida del acrosoma (ausencia de marcación o marcación ecuatorial) representen estadios funcionales distintos, debido a que en espermatozoides humanos (Talbot y Chacon, 1982) sólo las formas que presentan marcación en el segmento ecuatorial son capaces de unirse a la membrana plasmática del oocito. De este modo, se postula que estos espermatozoides serían los recientemente reaccionados, mientras que aquellos que carecen de marcación en todo el acrosoma habrían perdido su acrosoma con anterioridad en el tiempo, lo que los haría incapaces de interactuar con el oocito (Tesarik y col., 1993a).

Para la WGA, la mayor parte de los espermatozoides mostraron una marcación intensa en la región acrosomal y una marcación débil en la región postacrosomal, tal como ha sido encontrada en espermatozoides humanos (Virtanen y col., 1984; Lee y Damjanov, 1985; Cross y col., 1986; Cross y Overstreet, 1987); de bovino (Cross y Watson, 1994) y de cerdo (Aguas y Pinto da Silva, 1983; Jimenez y col., 2002,2003).

El ionóforo de calcio A23187 ha sido utilizado exitosamente en espermatozoides de carnero para inducir la exocitosis acrosomal (Shams-Borhan y Harrison, 1981; Watson y Plummer, 1986; Ben-Av y col., 1988; Watson y col., 1991). En este trabajo se halló un 66%, 60% y 66% de formas reaccionadas después de la exposición durante una hora al ionóforo de calcio utilizando PSA, PNA y WGA respectivamente. Debido a que el grado de exocitosis acrosomal es altamente dependiente de las condiciones de incubación y del estado de capacitación, estos resultados no pueden ser totalmente comparables con los resultados obtenidos por otros autores; de hecho, la incubación bajo condiciones idénticas llevan a los mismos valores de exocitosis acrosomal, independientemente de la lectina utilizada. Este no parece ser el caso de los espermatozoides humanos, en donde el uso de la PNA reveló un mayor porcentaje de reacción acrosómica que el uso de la PSA (Aitken y Brindle, 1993).

La criopreservación de espermatozoides causa un descenso en la movilidad (Keel y col., 1987), funcionalidad (Check y col., 1991), integridad de membrana (Holt y col., 1992 y Capítulo II de esta Tesis), daño en la teca perinuclear (Martinez y col., 2006) y velocidad (capítulo I de esta Tesis). Adicionalmente, un daño extensivo del acrosoma podría contribuir a la pérdida de acrosina (Pedersen y Lebech, 1971; Mack y Zaneveld, 1987; Centola y col., 1990; Cross y Hanks, 1991) y un consecuente descenso en la fecundidad. Por otra parte se sabe que la mayor parte del daño ocurriría durante el descongelamiento (Woolley y Richardson, 1978) y el daño físico al acrosoma sería secundario a la muerte celular (Cross y Hanks, 1991). A pesar de ello, nuestros resultados indican que la mayor parte de todos los espermatozoides que han sobrevivido al descongelamiento, o que al menos permanecen con sus membranas intactas, también mantienen sus acrosomas intactos. Estos resultados concuerdan con lo observado para espermatozoides de búfalo (Rasul y col., 2001) y de elefante (Sa-Ardrit y col., 2006). En contraste, los resultados obtenidos por Centola y col. (1990), McLaughlin y col. (1993) y Tao y col. (1993), indican que espermatozoides humanos congelados/descongelados viables tienen un mayor grado de daño acrosómico que los espermatozoides frescos.

Por otra parte, se debe tener en cuenta que la criorresistencia está relacionada con la composición de la membrana plasmática (Parks y Graham, 1992), y que estas membranas acrosomales y plasmáticas pueden diferenciarse en su composición (Holt y North, 1985). En el capítulo anterior se describió que cerca del 18% de los espermatozoides congelados/descongelados que poseen su membrana plasmática dañada tenían el acrosoma intacto cuando se utilizó CFDA/PI. Por otro lado se determinó que el 14% de los espermatozoides congelados/descongelados que fueron positivos a la tinción con Hoechst (membrana plasmática dañada) tenían sus acrosomas intactos según lo indica la unión de lectinas.

Estos resultados, junto con el hecho de que virtualmente todos los espermatozoides congelados/descongelados intactos presentan un patrón de marcación de lectinas normal, indican que, al menos en espermatozoides de carnero, la resistencia al daño por criopresevación de la membrana plasmática es menor que la de la membrana acrosomal, y por lo tanto, el cuidado de la primera es crítico para una criopreservación exitosa.

Como conclusión, podemos decir que la determinación del estado de la membrana acrosomal por el uso de lectinas es un método rápido, sencillo y altamente reproducible en una variedad de condiciones, y que asociado a un método de determinación de la viabilidad, resulta de interés para el conocimiento del estado estructural de los espermatozoides.

## **7. CAPITULO IV: Puesta a punto de un método para evaluar capacitación de los espermatozoides utilizando clortetraciclina (CTC)**

### **7.1. INTRODUCCION**

Los espermatozoides de mamíferos requieren de un proceso conocido como capacitación para fecundar los oocitos (Austin, 1951; Chang, 1951; Bedford, 1983). Este proceso, que ocurre fisiológicamente en el tracto femenino, consiste en una serie de modificaciones que incluyen la alteración o remoción de glicoproteínas periféricas, reordenamiento de proteínas integrales, pérdida del contenido de colesterol y cambios en la distribución y composición de los fosfolípidos de membrana (Yanagimachi, 1994). A pesar de que han sido desarrolladas varias hipótesis sobre el mecanismo por el cual los espermatozoides se capacitan, no hay duda de que la entrada de calcio es necesaria para que se produzca la capacitación y el inicio de la reacción acrosómica (Bedford, 1970; Tervit y col., 1972; Yanagimachi, 1994).

Diversos sistemas *in vitro* fueron propuestos para capacitar espermatozoides de carnero (Cheng y col., 1986; Crozet y col., 1987; Fukui y col., 1988; Cognie y col., 1991; Pugh y col., 1991), brindando una variada cantidad de herramientas para entender el proceso completo de capacitación y reacción acrosómica. Por otra parte, la incubación de espermatozoides en presencia del ionóforo de calcio A23187, que promueve la entrada de calcio sin capacitación, provoca una exocitosis acrosomal que semeja la reacción acrosómica fisiológica (Jamil y White, 1981; Shams-Borman y Harrison, 1981; Flechon y col., 1986).

La pérdida del contenido acrosomal durante la reacción acrosómica es relativamente fácil de evaluar por métodos citológicos (Talbot y Chacon, 1980,1981; Wolf y col., 1985). Como contraposición, los cambios que ocurren durante la capacitación, previamente a la reacción acrosómica, son mucho más difíciles de determinar.

El desarrollo de técnicas para poder determinar a nivel microscópico el grado de capacitación de espermatozoides es de gran ayuda e importancia para los análisis funcionales de espermatozoides y para comparar la eficacia de técnicas reproductivas asistidas.

La clortetraciclina (CTC) une calcio de membrana (Hallet y col., 1972), cuya distribución parecería cambiar durante la capacitación, y es fácilmente observable por microscopía de fluorescencia. De esta manera, el patrón de distribución de CTC parecería estar relacionado con los estadios de capacitación. El ensayo de unión de CTC (Saling y Storey, 1979; Ward y Storey, 1984) fue utilizado exitosamente para medir el grado de capacitación y reacción acrosómica en espermatozoides de distintas especies como el humano (Lee y col., 1987; Kholkute y col., 1992; DasGupta y col., 1993; Perry y col., 1995), el mono (Kholkute y col., 1990), el ratón (Ward y Storey, 1984; Fraser y Herod, 1990; Pietrobon y col., 2001), el caballo (Varner y col., 1987; Arns y col., 1991; Rathi y col., 2001; Schembri y col., 2002; Neild y col., 2003), el cerdo (Wang y col., 1995; Mattioli y col., 1996; Abeydeera y col., 1997; Huo y col., 2002; Kaneto y col., 2002), el toro (Dalvit y col., 1995; Fraser y col., 1995; Cormier y col., 1997; O'Flaherty y col., 1999; Collin y col., 2000; Dinkins y Brackett, 2000; Suzuki y col., 2003), el perro (Hewitt y England, 1998; Guerin y col., 1999; Rota y col., 1999), el cabrío (Kaul y col., 1997), el cobayo (Zhang y col., 2000) y el búfalo (Kaul y col., 2001).

En este capítulo, se presentan los resultados de la puesta a punto de la técnica de determinación de los distintos patrones de unión de clortetraciclina (CTC) en espermatozoides de carnero, inmediatamente después de ser eyaculados, después de una capacitación *in vitro* y de la inducción de exocitosis acrosomal por el uso de ionóforo de calcio A23187.

## **7.2. MATERIALES Y METODOS**

### **7.2.1. Capacitación *in vitro***

La capacitación de los espermatozoides se llevó a cabo según se describe en Materiales y Métodos Generales.

A tiempo 0 y 2 horas, las muestras fueron lavadas y resuspendidas en PBS para el ensayo de CTC (ver Materiales y Métodos Generales). Las muestras Control fueron espermatozoides lavados pero no incubados. La movilidad de los espermatozoides fue monitoreada antes y después de las incubaciones. Paralelamente se determinó la movilidad hiperactiva en forma subjetiva. En estas condiciones de capacitación, el semen mostró altos porcentajes de fecundación ( $64 \pm 3 \%$ ) en nuestro laboratorio de

Fertilización In Vitro, utilizando oocitos de oveja madurados *in vitro* (Baldassarre y col., 1994).

### **7.2.2. Inducción de la exocitosis acrosomal por el ionóforo de calcio A23187**

Para la remoción del plasma seminal, una alícuota de 10  $\mu$ l ( $4-5 \times 10^7$  espermatozoides) de semen puro fue colocada en un tubo cónico plástico de 15 ml (Falcon 352099, Becton Dickinson, NJ, USA) conteniendo 2 ml de medio Biggers, Whitten y Whittingham (BWW, Biggers y col., 1971) y centrifugada a 500 x g durante 8 minutos a temperatura ambiente, utilizando una centrífuga Routine RMM 44 (Industria Argentina). El sedimento fue resuspendido en el mismo medio y diluído hasta una concentración final de  $3 \times 10^7$  espermatozoides/ml. Una alícuota (0,5 ml) de esta suspensión fue mezclada en una placa multivial con un volumen igual de solución de ionóforo A23187 en medio BWW (preparado a partir de una solución madre 5 mM en dimetilsulfóxido (DMSO)), hasta llevarlo a una concentración final de 5  $\mu$ M de A23187 y 0,1% (v/v) DMSO. Las muestras fueron incubadas en estufa a 38,5°C en una atmósfera humidificada de 5 % de CO<sub>2</sub> en aire. Las muestras control contenían espermatozoides incubados sólo con 0,1 % de DMSO.

Después de 30 y 60 minutos de incubación en A23187, se tomaron alícuotas para la determinación de CTC. La exocitosis acrosomal se evaluó por microscopía de contraste diferencial de interferencia (DIC).

### **7.2.3. Marcación con clortetraciclina (CTC)**

Se preparó una solución de CTC (1 mM) en un buffer conteniendo Tris 20 mM, NaCl 130 mM y cisteína 5 mM, pH 7,8 . La reacción se inició mezclando 10  $\mu$ l de la muestra de semen ( $200 \times 10^6$  espermatozoides/ml) con 10  $\mu$ l de la solución de CTC, sobre un portaobjetos de baja fluorescencia, a temperatura ambiente. Después de 15 segundos, se detuvo la reacción por el agregado de 5  $\mu$ l de una solución de glutaraldehído 12,5% (v/v) preparada en Tris-HCl 2 M, pH 7,8. Las muestras así preparadas fueron cubiertas con un cubreobjetos de 24 x 48 mm y almacenadas en oscuridad a 4°C. Para la evaluación de los patrones de CTC, las muestras fueron observadas dentro de las 24 horas de haber sido preparadas en un microscopio de epifluorescencia Nikon Optiphot utilizando un filtro V-2A. Todas las muestras se procesaron por duplicado y se contaron



no menos de 150 espermatozoides por portaobjeto. No se observó fluorescencia cuando la CTC fue omitida de la preparación.

#### **7.2.4. Análisis de movilidad**

La movilidad fue evaluada utilizando el Sistema de Análisis Automatizado de Espermatozoides CellTrak/S<sup>TM</sup> (CASA) (Motion Analysis Co, Santa Rosa, CA, USA) calibrado para espermatozoides de carnero según se describe en el Capítulo I de la presente Tesis.

#### **7.2.5. Análisis estadístico**

Los datos fueron analizados utilizando ANOVA y un test de Dunnett a posteriori. Previamente, los datos fueron transformados utilizando una transformación angular (Steel y Torrie, 1981).

### **7.3. RESULTADOS**

En semen fresco se encontraron 4 formas diferentes de la distribución de CTC en la cabeza del espermatozoide de carnero (Formas I a IV). Estas formas se presentan en la Figura 1.

La Forma I presenta una distribución homogénea de la fluorescencia en toda la cabeza, con una banda más brillante en la región ecuatorial (Figura 1A). En la Forma II, se encontró fluorescencia uniforme, pero un poco menor que en la Forma I, y no aparece la banda ecuatorial presente en la Forma I (Figura 1B). La Forma III se caracteriza por presentar fluorescencia en la porción anterior de la cabeza y no presentar fluorescencia en la región postacrosomal (Figura 1C). La Forma IV carece de fluorescencia en la cabeza (Figura 1D). Estas 4 formas constituyen más del 95% de las formas encontradas en el semen eyaculado (fresco). Una forma menor, ya que se encontró sólo ocasionalmente, es aquella que presenta fluorescencia restringida a la región postacrosomal.

La identificación de las Formas I a IV en 20 muestras de semen fresco con alta movilidad de espermatozoides, indicó que la Forma I es la más importante ( $78 \pm 2 \%$ ), mientras que las Formas II y III fueron escasas ( $13 \pm 1 \%$  y  $5 \pm 1 \%$  respectivamente).

La Forma IV no se encontró en este tipo de semen, o aparece sólo ocasionalmente en el eyaculado (menos del 1 %).

Tanto la capacitación *in vitro* como la inducción de la exocitosis acrosomal se llevaron adelante para poder asignar a cada forma de CTC un estadio específico. El efecto de la capacitación *in vitro* sobre la distribución del patrón de CTC se presenta en la Tabla I.

	Control	Lavado	Incubado 2 horas
Formas I (%)	77 ± 3	10 ± 2*	0*
Formas II (%)	15 ± 3	33 ± 6*	25 ± 2
Formas III (%)	7 ± 3	55 ± 6*	68 ± 3*
Formas IV (%)	1 ± 1	2 ± 1	7 ± 3*

Tabla I. Porcentaje de Formas I, II, III y IV de unión de CTC en espermatozoides de carnero inmediatamente después de la eyaculación (control), después del lavado en PBS con una alta concentración de BSA, y después de una incubación en condiciones capacitantes en medio SOF-m con 20% de suero de oveja en estro inactivado por calor. N= 10 \* P<0,01 vs control

Se puede ver que la dilución, el lavado en PBS conteniendo BSA y la resuspensión en SOF-m producen un descenso significativo en las Formas I y un aumento significativo en las Formas II y III. El efecto aumentó por una incubación posterior durante 2 horas en medio SOF-m con 20% de suero de oveja en estro inactivado por calor. Un 7% de los espermatozoides mostró Formas IV después del lavado y la incubación por 2 horas (siendo esto último considerado como las condiciones standard de una capacitación).

La evaluación del estado acrosomal por DIC luego de la capacitación *in vitro* mostró que un 5% de los espermatozoides habían sufrido reacción acrosómica y un 60% habían experimentado algún grado de modificación o alteración del acrosoma. Con el objeto de determinar la ocurrencia de reacción acrosómica dentro de cada forma, se evaluaron los patrones de CTC y el estado acrosomal en los mismos espermatozoides de muestras capacitadas. Los resultados se presentan en la Tabla II.

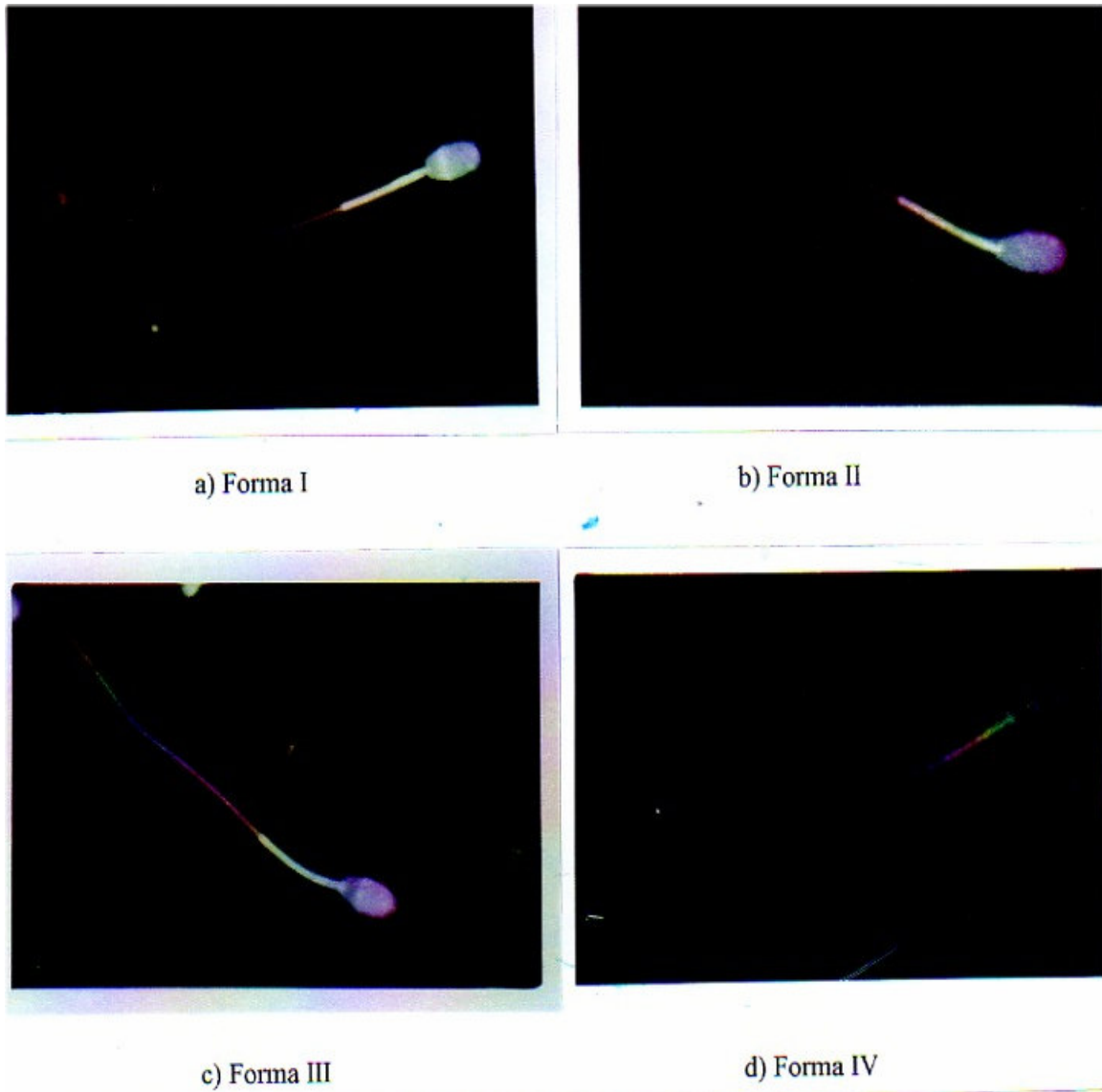


Figura 1. Patrones de fluorescencia de clortetraciclina (CTC) en espermatozoides de carnero. a) Forma I, fluorescencia en toda la cabeza, con una banda ecuatorial brillante; b) Forma II, fluorescencia uniforme en toda la cabeza pero sin banda ecuatorial; c) Forma III, fluorescencia en la parte anterior de la cabeza y d) Forma IV, sin fluorescencia en la cabeza. En todos los casos se observa tinción en parte del flagelo.

	Intactos (%)	Intermedios (%)	Reaccionados (%)
Formas II	86 ± 14	14 ± 11	0
Formas III	16 ± 8	77 ± 11	7 ± 4

Tabla II. Estado acrosomal de los espermatozoides que presentaban un patrón de CTC en Formas II y III, en espermatozoides de carnero capacitados *in vitro*. El estado acrosomal fue evaluado por microscopía DIC como se indica en Materiales y Métodos. Los valores representan el porcentaje de espermatozoides con acrosomas intactos, modificados y reaccionados en cada forma de CTC. N= 5

Debido a que las Formas II y III constituyen el 99% de todas las células, sólo se presentan los resultados del estado acrosomal de estas formas. Es evidente que las Formas II están asociadas mayoritariamente con acrosomas intactos, aunque aparecen algunas formas con alteraciones tempranas en el acrosoma (formas intermedias). En contraste, la mayoría de los espermatozoides en Forma III (77%) muestran formas intermedias de pérdida del acrosoma.

La incubación de los espermatozoides con el ionóforo de calcio A23187 durante 60 minutos resultó en un 56% de los espermatozoides presentando Formas IV (Tabla III).

	Control	A23187 30'	A23187 60'
Formas I (%)	77 ± 5	3 ± 1*	0*
Formas II (%)	19 ± 3	33 ± 2*	2 ± 1*
Formas III (%)	3 ± 3	58 ± 2*	42 ± 2*
Formas IV (%)	1 ± 1	6 ± 2*	56 ± 3*

Tabla III. Porcentaje de Formas I, II, III y IV de unión de CTC en espermatozoides de carnero inmediatamente después de la eyaculación (control) y después de la incubación con ionóforo A23187 durante 30 o 60 minutos. N= 5 \* P<0,01 vs control

Esta forma, que fue la única que se acumuló durante la incubación, representa el estadio final del proceso, que es, el espermatozoide totalmente reaccionado. Las Formas I decaen abruptamente a los 30 minutos de incubación, y no se encuentran después de los 60 minutos. En contraste, las Formas II y III aumentan a los 30 minutos, pero disminuyen más tarde, sugiriendo que ambas formas representan estadios intermedios

anteriores a la exocitosis acrosomal. La incubación durante 60 minutos con DMSO sólo produjo un cambio no significativo en los patrones de CTC.

La inducción de la exocitosis acrosomal por el uso de A23187 fue confirmada por el uso de microscopía de contraste por interferencia diferencial. Un 56% de los espermatozoides mostraron una pérdida acrosomal completa, mientras que un 34% presentaron estados intermedios. El análisis del estado acrosomal en espermatozoides de formas individuales de CTC reveló que todos los espermatozoides que estaban en Forma II después de la incubación tenían sus acrosomas intactos. Los estadios intermedios fueron predominantes (76%) en espermatozoides con Formas III, mientras que la mayoría (92%) de los espermatozoides en Forma IV habían sufrido una exocitosis acrosomal completa (Tabla IV).

	Intactos (%)	Intermedios (%)	Reaccionados (%)
Formas II	100 ± 0	0	0
Formas III	11 ± 3	76 ± 7	13 ± 6
Formas IV	6 ± 1	2 ± 2	92 ± 1

Tabla IV. Estado acrosomal de espermatozoides que presentan Formas II, III y IV de unión de CTC en espermatozoides de carnero incubados con ionóforo A23187 durante 60 minutos. El estado acrosomal fue evaluado por microscopía DIC como se indica en Materiales y Métodos. Los valores representan el porcentaje de espermatozoides con acrosomas intactos, modificados y perdidos en cada forma de CTC. N= 5. No se encontraron Formas I en ninguna de las muestras.

#### 7.4. DISCUSION

Estos resultados demuestran que el patrón de marcación de CTC puede ser utilizado para monitorear los cambios en los espermatozoides de carnero durante la capacitación y la exocitosis acrosomal.

Tres de las formas encontradas son equivalentes a aquellas encontradas en otras especies (Ward y Storey, 1984; Lee y col., 1987; Varner y col., 1987; Kholkute y col., 1990; Kaul y col., 1997; Hewitt y England, 1998; Kaneto y col., 2002). La Forma I es citada en la bibliografía como "fresco temprano" (early fresh), EF o F por algunos autores; la Forma III es citada como "oscura posterior" (dark posterior), DP o B; y la

Forma IV es citada como "acrosoma reaccionado" (acrosome reacted) o AR. La Forma II parece ser única para espermatozoides de carnero. La forma I es la más abundante en el semen inmediatamente después de la eyaculación, y disminuye durante la capacitación y la reacción acrosómica, sugiriendo fuertemente que esta forma representa el estado no capacitado. La Forma IV se incrementa masivamente después de la inducción de la exocitosis acrosomal, de modo que representa el estado del espermatozoide con acrosoma reaccionado. Las Formas II y III muestran un incremento temprano y transitorio durante la incubación con ionóforo, sugiriendo que representan formas intermedias. Los resultados mostrados en la Tabla I indican que durante la capacitación, las Formas II aumentan mientras que las Formas III se acumulan. Así, las Formas II representarían un estadio más temprano de la capacitación que las Formas III. Entonces, se puede decir que la aparición de diferentes patrones de capacitación y de la reacción acrosómica sigue la secuencia temporal: I → II → III → IV. Esto está en total acuerdo con los resultados de microscopía de DIC (Tablas II y IV): durante la capacitación, la mayoría de los espermatozoides en Forma II muestran acrosomas intactos, mientras que los espermatozoides en Forma III presentan estadios intermediarios de pérdida acrosomal. Además, la alteración en las estructuras de membrana parecerían empezar en la Forma III. La reacción acrosómica completa es muy poco frecuente en esta Forma. Es importante destacar que el porcentaje de estadios intermediarios en espermatozoides en Forma III es igual en espermatozoides capacitados y los reaccionados por ionóforo ( $77 \pm 11$  y  $76 \pm 7$ , Tablas II y IV). En contraste, el 92% de los espermatozoides en Forma IV, después del tratamiento con A23187, presentaron una exocitosis acrosomal completa. De todos modos, es importante destacar que después de la capacitación o el tratamiento con A23187, algunos espermatozoides que permanecieron en Forma III se encuentran reaccionados según DIC (Tablas II y IV), lo que lleva a pensar que los espermatozoides en Forma III están listos para sufrir reacción acrosómica, mientras que los que están en Forma IV sólo aparecen después de una exocitosis completa. En nuestro caso, la Forma IV es semejante a la descrita para espermatozoides equinos por Varner y col. (1987) y no a la descrita por Arns y col. (1991) para esa misma especie.

Los lavados reiterados del semen en PBS-BSA y posterior resuspensión en SOF-m, un procedimiento utilizado para la capacitación y la fecundación *in vitro*, lleva a una gran disminución de Formas I y un aumento de Formas II y III (ver Tabla I), sugiriendo que

la capacitación comienza durante estos pasos. Estos resultados coinciden con lo observado por Maxwell y Johnson (1997) en espermatozoides de cerdo. Además, esto está de acuerdo con la hipótesis que postula que los lavados remueven los componentes decapacitantes presentes en la membrana plasmática (Johnson, 1975; O'Rand, 1979; Fraser, 1982). Alternativamente, los lavados repetidos podrían alterar la distribución de calcio en la membrana plasmática de un modo no necesariamente relacionado con la capacitación. Sin embargo, este no parecería ser el caso en vista de los cambios específicos producidos en dicha región observables durante el lavado, coincidente con aquellos que tienen lugar durante la capacitación.

Otro elemento destacable es que hemos observado que la presencia de calcio durante el ensayo de CTC es un factor crítico para la aparición de las distintas formas de unión de CTC. La remoción del calcio o el agregado de agentes quelantes resultan en una desaparición completa del patrón de unión de CTC (datos no presentados). Esto es importante para la puesta a punto de las condiciones del ensayo. En este sentido, y para tal propósito, en todas las instancias, las muestras deben ser rápidamente lavadas y resuspendidas en PBS previamente al ensayo. Teniendo esto en cuenta, los cambios observados en este estudio son debido a la capacitación de los espermatozoides y no debidos a artefactos de técnica.

En conclusión, se ha puesto a punto el ensayo de CTC y validado para espermatozoides de carnero. De esta manera, se puede monitorear efectivamente la capacitación *in vitro* y la reacción acrosómica. Esta técnica se utilizará para las evaluaciones de capacitación de espermatozoides en los restantes capítulos de esta Tesis.

## **8. CAPITULO V: Efecto del ácido gama-aminobutírico en la capacitación *in vitro* de espermatozoides de carnero.**

### **8.1. INTRODUCCION**

La identificación en los fluidos del tracto femenino del factor o los factores que regulan la capacitación de los espermatozoides podrían ayudar en el diseño de un medio químicamente definido para ser utilizado en la fecundación *in vitro* y otras técnicas relacionadas. Entre estos factores, el GABA ha sido recientemente propuesto como un posible modulador de la función espermática.

Por otra parte, tal como se ha señalado en la Introducción de esta tesis, distintas evidencias indican que la fosforilación de proteínas participa en el control de la función espermática durante la capacitación, la reacción acrosómica y la fecundación (Tesarik y col., 1993b; Burks y col., 1995; Visconti y col., 1995a,b; Tomes y col., 1996, 1998; Brewis y col., 1998; Flesch y col., 1999; Naz y Rajesh, 2004 y citas mencionadas en la Introducción de la presente Tesis). Esto nos indujo a explorar la posibilidad de evidenciar un efecto del GABA sobre este parámetro como un indicador adicional de la capacitación.

En este capítulo, se presenta el efecto capacitante *in vitro* del GABA en espermatozoides de carnero de acuerdo al ensayo de clortetraciclina (CTC) puesto a punto como se indica en el Capítulo IV de esta Tesis, y a través de la fosforilación en residuos tirosina. Para ello, en una serie de ensayos se determinó el patrón de marcación en espermatozoides de carnero por inmunofluorescencia indirecta con el uso de un anticuerpo antifosfotirosina en muestras no capacitadas y capacitadas. Además, en este capítulo, se demuestra que este efecto del GABA es mediado por su interacción con un receptor de tipo GABA<sub>A</sub>.



## **8.2 METODOS**

### **8.2.1 Incubación de espermatozoides**

Se utilizó la metodología descrita en Materiales y Métodos Generales con algunas modificaciones. Alícuotas de semen (100  $\mu$ l) fueron lavados en 4 ml de medio Biggers, Whitten y Wittingham (BWW) (Biggers y col., 1971) sin BSA o suero, suplementado con HEPES 10  $\mu$ M y ajustado a un pH de 7,4 con NaOH 0,1 N, en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Este medio será referido de ahora en adelante como BWW modificado (BWW-m). Las suspensiones espermáticas fueron centrifugadas a 500x g durante 10 minutos en tubos cónicos de 15 ml a temperatura ambiente. El precipitado fue resuspendido en BWW-m hasta llevarlo a una concentración de 10<sup>8</sup> espermatozoides/ml. Alícuotas (500  $\mu$ l) de esta suspensión fueron mezcladas en viales plásticos de 1 ml con un volumen igual de BWW-m solo (control) o con BWW-m conteniendo GABA, agonistas de GABA, o antagonistas de GABA hasta una concentración específica en cada ensayo. Las muestras fueron incubadas a 38,5°C en placas multiviales, bajo atmósfera humidificada de 5% de CO<sub>2</sub> en aire. A intervalos de una hora, durante un período de 4 horas, se tomaron alícuotas de cada muestra y se determinó el grado de capacitación por el ensayo de CTC o fueron incubadas con ionóforo de calcio A23187 para la inducción de la reacción acrosómica. Como control, todas las muestras fueron analizadas por el método de CTC después del lavado pero sin incubación.

### **8.2.2 Análisis de movilidad y viabilidad espermática**

La movilidad de los espermatozoides fue monitoreada antes y después de las incubaciones por medio del Sistema de Análisis Automatizado de Espermatozoides CellTrak/S™ según la calibración puesta a punto para semen de carnero (Capítulo I de esta Tesis).

Se determinó la viabilidad por el método de CFDA/PI según se describe en Capítulo II de esta Tesis.

### **8.2.3. Inducción de la exocitosis acrosomal por el ionóforo de calcio A23187**

Alícuotas de suspensiones de semen (450  $\mu$ l) incubadas como se describió anteriormente, fueron transferidas a viales plásticos de 1 ml que contenían 50  $\mu$ l de

ionóforo A23187 50  $\mu\text{M}$  en BWW-m, preparado a partir de una solución madre 5 mM en DMSO, hasta obtener una concentración final de A23187 5  $\mu\text{M}$ . Las muestras fueron incubadas durante 15 minutos en ionóforo e inmediatamente procesadas para la evaluación de la integridad acrosomal después de la tinción con la lectina *Pisum sativum* (PSA). La integridad acrosomal fue confirmada por el uso de microscopio de contraste de interferencia diferencial (DIC) (Watson y col., 1991).

Las categorías establecidas para el análisis de la integridad acrosomal son las expuestas en el Capítulo III de esta Tesis. Se observaron al menos 200 espermatozoides por muestra, por duplicado.

#### **8.2.4. Ensayo de CTC**

Tanto la técnica utilizada como los patrones de CTC encontrados en espermatozoides de carnero se encuentran descritos en el Capítulo IV de esta Tesis. No se observó fluorescencia cuando la CTC fue omitida de la preparación.

#### **8.2.5. Determinación del patrón de unión de lectina PSA**

Se utilizó una modificación del procedimiento descrito por Cross y col. (1986). Las suspensiones de espermatozoides fueron centrifugadas a 2000x g durante 90 segundos en una Microcentrífuga Eppendorf Modelo 5414 (Hamburgo, Alemania) y el precipitado resultante fue resuspendido y fijado en etanol 95% a 4°C durante 5 minutos. Las suspensiones fueron centrifugadas, lavadas en 1 ml de PBS a temperatura ambiente y resuspendidas en 90  $\mu\text{l}$  de PBS. La marcación se realizó por el agregado de 10  $\mu\text{l}$  de una solución que contenía 100  $\mu\text{g/ml}$  de la lectinas PSA en PBS. La solución fue incubada en baño térmico a 37°C y en oscuridad durante 12 minutos. Luego se lavó por centrifugación con 1 ml de PBS para extraer el exceso de lectina, y el precipitado se resuspendió en 50  $\mu\text{l}$  de una solución de montaje consistente en 90% (v/v) de glicerol en PBS. Se tomó una alícuota de esta suspensión y se montó en portaobjetos de baja fluorescencia, se cubrió con cubreobjeto y se observaron al menos 150 espermatozoides por portaobjeto, por duplicado, en un microscopio Nikon Optiphot de epifluorescencia, utilizando el filtro B-2A. Los espermatozoides con pérdida parcial o total del acrosoma fueron considerados con exocitosis acrosomal.

### **8.2.6. Determinación del grado de fosforilación por inmunofluorescencia indirecta**

Se lavaron alícuotas de 10  $\mu$ l de semen en 1 ml de PBS y se fijaron con formaldehído 3%-glutaraldehído 0,1% durante 2 horas a temperatura ambiente. Después del lavado en PBS, los espermatozoides fueron permeabilizados por un tratamiento con Triton X-100 0,1% en PBS durante 10 minutos a 37°C, y luego lavados en PBS. Para bloquear sitios no específicos, las muestras fueron incubadas durante 1 hora en 10% de suero de caballo y lavados en PBS. El precipitado fue incubado con el anticuerpo monoclonal antifosfotirosina de ratón PY-20 durante 3 horas a temperatura ambiente. Después del lavado en PBS, las muestras fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpo anti-IgG conjugado con FITC (10  $\mu$ g/ml) en PBS conteniendo 3 mg/ml BSA, y luego lavado en PBS. Después de la resuspensión en glicerol 90% en PBS, las muestras fueron montadas en portaobjetos y observadas en el microscopio de epifluorescencia Nikon Optiphot utilizando un filtro B-2A.

Los controles incluyeron incubaciones sin el anticuerpo primario o secundario. En ninguno de los casos se observó fluorescencia.

### **8.2.7. Análisis estadísticos**

Los datos fueron analizados utilizando ANOVA y un test de múltiples comparaciones Tukey-Kramer a posteriori. Previamente, los datos fueron transformados utilizando una transformación angular (Steel y Torrie, 1981).

## **8.3. RESULTADOS**

En un primer ensayo se determinó el efecto del GABA en una concentración 20  $\mu$ M sobre la capacitación de espermatozoides de carnero en función del tiempo (hasta 4 horas de incubación). En forma paralela, se utilizó un control positivo de la capacitación consistente en la incubación en BWW-m con el agregado de 4 mg/ml de BSA. Los resultados, que se presentan en la Tabla I, demuestran un efecto del GABA en la capacitación de espermatozoides (medido a través del incremento de formas III de CTC) que se pone de manifiesto a partir de las 2 horas de incubación de los mismos y se mantiene constante hasta las 4 horas de incubación.

En ningún caso se observó fluorescencia cuando la CTC fue omitida de la preparación.

Por otra parte, el control utilizado (BWW-m) demostró ser un medio efectivamente no capacitante (no hay diferencias significativas entre el Control a tiempo 0 y el control a 4 horas).

Tabla I. Efecto del GABA (20  $\mu$ M) sobre la capacitación de espermatozoides de carnero en función del tiempo.

	Tiempo (h)	Forma I (%)	Forma II (%)	Forma III (%)	Forma IV (%)	Viables (%)	Móviles (%)
BWW-m	0	85 $\pm$ 1	10 $\pm$ 2	4 $\pm$ 2	0 $\pm$ 0	71 $\pm$ 6	72 $\pm$ 3
	1	82 $\pm$ 3	12 $\pm$ 2	5 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1		
	2	80 $\pm$ 8	10 $\pm$ 7	9 $\pm$ 5	1 $\pm$ 1		
	3	76 $\pm$ 5	15 $\pm$ 6	7 $\pm$ 3	2 $\pm$ 1		
	4	72 $\pm$ 5	19 $\pm$ 4	8 $\pm$ 3	1 $\pm$ 1	64 $\pm$ 6	64 $\pm$ 4
BWW-m + BSA	1	29 $\pm$ 3	58 $\pm$ 6	13 $\pm$ 4	1 $\pm$ 1		
	2	12 $\pm$ 1	65 $\pm$ 3	22 $\pm$ 3**	1 $\pm$ 1		
	3	9 $\pm$ 2	60 $\pm$ 4	29 $\pm$ 3**	3 $\pm$ 1		
	4	5 $\pm$ 1	59 $\pm$ 2	33 $\pm$ 3**	3 $\pm$ 1	64 $\pm$ 5	60 $\pm$ 6
BWW-m +GABA	1	84 $\pm$ 4	12 $\pm$ 4	4 $\pm$ 2	0 $\pm$ 0		
	2	74 $\pm$ 8	10 $\pm$ 8	14 $\pm$ 1*	2 $\pm$ 1		
	3	68 $\pm$ 5	14 $\pm$ 4	15 $\pm$ 2**	3 $\pm$ 1		
	4	54 $\pm$ 2	25 $\pm$ 2	18 $\pm$ 2**	3 $\pm$ 1	63 $\pm$ 6	62 $\pm$ 5

Los espermatozoides fueron incubados en medio m-BWW sólo o conteniendo BSA (4 mg/ml) ó GABA 20  $\mu$ M. La capacitación fue evaluada por el porcentaje de Formas I a IV del patrón de marcación de CTC entre 1 y 4 horas de incubación. Los resultados se expresan como Media  $\pm$  D.S. para cinco eyaculados diferentes. \* P<0,05 ; \*\*P<0,01 vs sus respectivos controles para cada tiempo de incubación.

A partir de estos resultados se decidió adoptar para los posteriores estudios analizar el efecto de los distintos compuestos a las 4 horas de incubación.

En una segunda serie de ensayos se determinó el efecto de distintas concentraciones de GABA en la capacitación de espermatozoides de carnero medidos a tiempo fijo (4 horas). Los resultados se presentan en la Tabla II.

Tabla II. Efecto del GABA a distintas concentraciones sobre la capacitación en espermatozoides de carnero incubado durante 4 horas.

	Forma I (%)	Forma II (%)	Forma III (%)	Forma IV (%)	Viables (%)	Móviles (%)
No incubados	77 ± 3 <sup>a</sup>	13 ± 2 <sup>a</sup>	9 ± 2 <sup>a</sup>	1 ± 1	68 ± 5	69 ± 6
Control	72 ± 5 <sup>a</sup>	20 ± 3 <sup>ab</sup>	7 ± 2 <sup>a</sup>	1 ± 1	64 ± 6	67 ± 6
GABA, 1 μM	57 ± 2 <sup>b</sup>	26 ± 3 <sup>b</sup>	15 ± 2 <sup>b</sup>	2 ± 1	63 ± 7	66 ± 7
GABA, 5 μM	54 ± 1 <sup>bc</sup>	20 ± 2 <sup>ab</sup>	24 ± 3 <sup>c</sup>	2 ± 1	64 ± 7	65 ± 7
GABA, 20 μM	48 ± 1 <sup>c</sup>	24 ± 2 <sup>b</sup>	26 ± 3 <sup>c</sup>	2 ± 1	63 ± 6	63 ± 8
GABA, 50 μM	48 ± 1 <sup>c</sup>	25 ± 2 <sup>b</sup>	24 ± 3 <sup>c</sup>	3 ± 1	61 ± 8	64 ± 7

Los espermatozoides fueron incubados en medio BWW-m solo o conteniendo GABA a las concentraciones indicadas. La capacitación fue evaluada por el porcentaje de Formas I a IV del patrón de marcación de CTC. “No incubados” se refiere a muestras lavadas sin incubación, mientras que “control” se refiere a muestras lavadas e incubadas en BWW-m, en ausencia de GABA. Los resultados se expresan como Media ± D.S. para cinco eyaculados diferentes. Los valores con diferentes superíndices dentro de cada columna difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

Del análisis de la Tabla II se concluye que la incubación en condiciones control no indujo la capacitación de los espermatozoides (compárese No incubados vs Control) y que la acción del GABA aumentó el porcentaje de formas III de una manera concentración-dependiente. Además, este efecto fue estadísticamente significativo a una concentración de 1 μM y máximo a partir de 5 μM.

Esta es la evidencia más directa de la acción del GABA sobre la capacitación. No obstante, para reforzar esta idea recurrimos al ensayo de inducción de la reacción acrosómica. Este se basa en evidencias, halladas en otras especies, que sugieren que en espermatozoides capacitados, la reacción acrosómica ocurre más rápidamente que en los no capacitados; por lo tanto, la determinación de esta velocidad da una idea adicional del estado de la capacitación. Como se observa en la Figura 1, cuando los espermatozoides previamente incubados con GABA durante 4 horas son tratados con ionóforo A23187 durante 15 minutos, se observa un mayor porcentaje de espermatozoides con exocitosis acrosomal a concentraciones crecientes de GABA. Así, existen diferencias significativas en los porcentajes de espermatozoides reaccionados cuando las muestras fueron incubadas con concentraciones 20 μM y 50 μM de GABA.

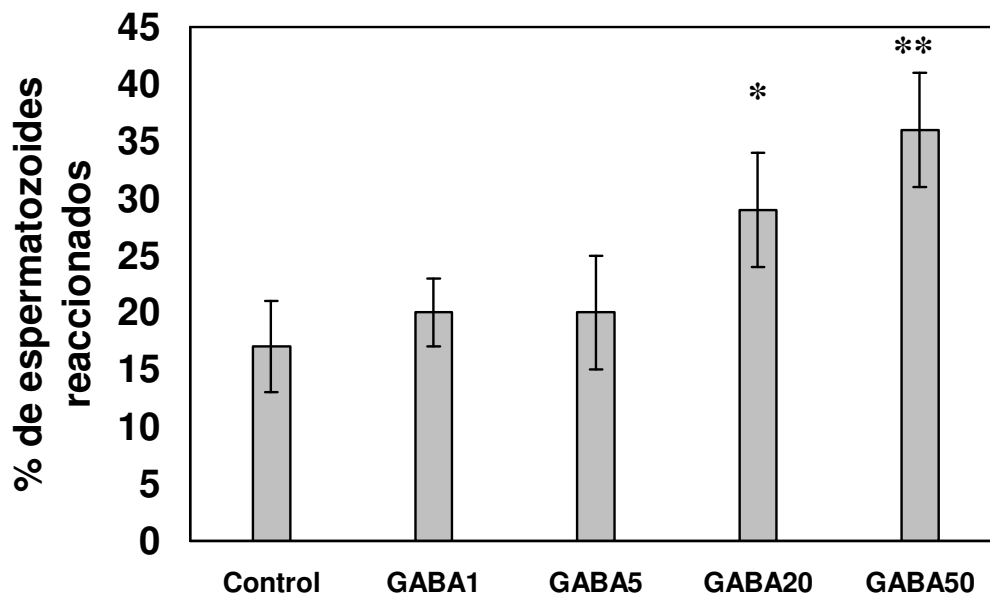


Figura 1. Efecto de la incubación de espermatozoides en presencia de GABA sobre el porcentaje de espermatozoides con reacción acrosómica luego de la inducción por A23187. GABA 1 a GABA 50: GABA de 1 a 50  $\mu$ M. Las barras representan la Media  $\pm$  D.S. para cinco eyaculados. \*  $P < 0,05$  ; \*\* $P < 0,001$  vs Control.

Con el objeto de determinar si el efecto observado es mediado por la unión del GABA a un receptor, se realizaron experimentos utilizando agonistas tanto del receptor  $GABA_A$  como del receptor  $GABA_B$ . Se utilizaron dos concentraciones diferentes (1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M) de muscimol (agonista del receptor  $GABA_A$ ) y de baclofen (agonista del receptor  $GABA_B$ ). La capacitación se determinó por el ensayo de CTC luego de 4 horas de incubación y también se determinó la viabilidad y movilidad de las muestras luego de la incubación para descartar un efecto tóxico de estos compuestos sobre los espermatozoides a las concentraciones utilizadas. Los resultados se presentan en la Tabla III.

Tabla III. Efecto del muscimol y baclofen sobre los estadios de capacitación de espermatozoides de carnero.

	Forma I (%)	Forma II (%)	Forma III (%)	Forma IV (%)	Viables (%)	Móviles (%)
Control	78 ± 1	13 ± 2	8 ± 1	1 ± 1	68 ± 5	67 ± 5
GABA, 20 µM	64 ± 5 <sup>c</sup>	17 ± 2	13 ± 4 <sup>a</sup>	6 ± 3 <sup>a</sup>	66 ± 6	66 ± 6
Muscimol, 1 µM	64 ± 6 <sup>c</sup>	19 ± 5	11 ± 2	6 ± 1 <sup>b</sup>	65 ± 7	64 ± 8
Muscimol, 10 µM	61 ± 4 <sup>c</sup>	17 ± 6	15 ± 3 <sup>c</sup>	7 ± 3 <sup>b</sup>	65 ± 5	64 ± 5
Baclofen, 1 µM	79 ± 3	14 ± 2	6 ± 1	1 ± 1	65 ± 6	65 ± 6
Baclofen, 10 µM	76 ± 4	14 ± 3	8 ± 2	2 ± 1	64 ± 7	63 ± 8

Los espermatozoides fueron incubados en medio BWB-m solo (Control) o conteniendo GABA o uno de los agonistas indicados. La capacitación fue evaluada por el porcentaje de Formas I a IV del patrón de marcación de CTC. Los resultados se expresan como Media ± D.S. para cinco eyaculados diferentes. <sup>a</sup> p < 0,05; <sup>b</sup> p < 0,01; <sup>c</sup> p < 0,001 vs control.

De acuerdo con los resultados obtenidos, el uso de muscimol a una concentración 10 µM tuvo un efecto capacitante similar al producido por el GABA a una concentración 20 µM. En contraste, el baclofen a la misma concentración no fue efectivo para imitar el efecto del GABA en la capacitación. Adicionalmente, no hubo efecto tóxico al estudiar las dos concentraciones de agonistas utilizadas.

Al analizar el efecto de los agonistas sobre la reacción acrosómica (Figura 2), vemos que el muscimol en las dos concentraciones utilizadas (1 y 10 µM ) tuvo un efecto semejante al producido por el GABA 20 µM, mientras que el baclofen no produjo efecto alguno sobre el porcentaje de espermatozoides reaccionados.

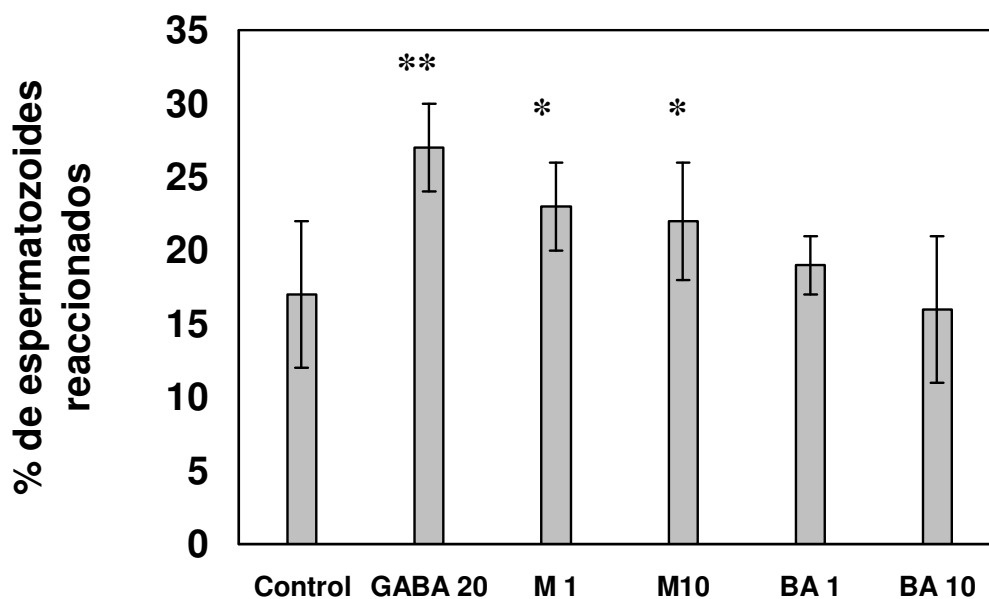


Figura 2. Efecto del muscimol y baclofen sobre la reacción acrosómica de espermatozoides de carnero. Los espermatozoides fueron incubados durante 4 horas en medio BWW-m solo (Control) o conteniendo GABA o uno de los agonistas indicados y posteriormente incubados en A23187 5 $\mu$ M durante 15 minutos. GABA 20: GABA 20  $\mu$ M; M 1 y 10: Muscimol 1 y 10  $\mu$ M; BA1 y 10: Baclofen 1 y 10  $\mu$ M. Las barras representan la Media  $\pm$  D.S. para ocho eyaculados diferentes. \* P<0,05 ; \*\*P<0,001 vs Control.

Estos resultados sugieren que el receptor involucrado en el efecto del GABA sobre la capacitación de los espermatozoides de carnero sería un receptor de tipo GABA<sub>A</sub>. Para confirmar esta hipótesis, se realizaron estudios de farmacología del receptor GABA<sub>A</sub>. En el primero de estos estudios, se analizó el bloqueo de la acción del GABA por incubación con antagonistas específicos del receptor GABA<sub>A</sub> (bicuculina y picrotoxina). Como se observa en la Tabla IV, la coincubación de espermatozoides con GABA y bicuculina o picrotoxina anuló completamente el efecto previamente observado. Además, ninguna de las drogas tuvo algún efecto *per se*, indicando que esta inhibición no obedece a una acción tóxica o colateral, sino a un efectivo bloqueo de la acción gabaérgica. En forma análoga a lo hallado en los experimentos anteriores, el bloqueo de la acción del GABA por bicuculina y picrotoxina también se refleja en la inducibilidad de la reacción acrosómica por A23187 (Figura 3).



Tabla IV. Efecto del GABA y antagonistas del receptor GABA<sub>A</sub> sobre los estadios de capacitación del espermatozoide de carnero.

	Forma I (%)	Forma II (%)	Forma III (%)	Forma IV (%)	Viables (%)	Móviles (%)
Control	74 ± 5	17 ± 6	7 ± 3	2 ± 1	69 ± 6	68 ± 5
GABA 20 μM	61 ± 1 <sup>b</sup>	26 ± 3	12 ± 3 <sup>a</sup>	1 ± 1	65 ± 6	66 ± 6
G + B	71 ± 3	22 ± 3	6 ± 1	1 ± 1	63 ± 7	64 ± 7
G + P	72 ± 4	19 ± 3	7 ± 1	2 ± 1	65 ± 5	64 ± 5
Bicuculina 1 μM	71 ± 7	21 ± 8	7 ± 2	1 ± 1	64 ± 6	66 ± 6
Picrotoxina 1 μM	70 ± 4	21 ± 5	7 ± 2	1 ± 1	64 ± 7	66 ± 6

Los espermatozoides fueron incubados durante 4 horas en medio BWW-m solo (Control) o conteniendo 20 μM GABA (G), 1 μM bicuculina (B), 1 μM picrotoxina (P) o una combinación de GABA y uno de los antagonistas de GABA. La capacitación fue evaluada por el porcentaje de Formas I a IV del patrón de marcación de CTC. Los resultados se expresan como Media ± D.S. para seis eyaculados diferentes. <sup>a</sup> p < 0,05; <sup>b</sup> p < 0,001 vs control.

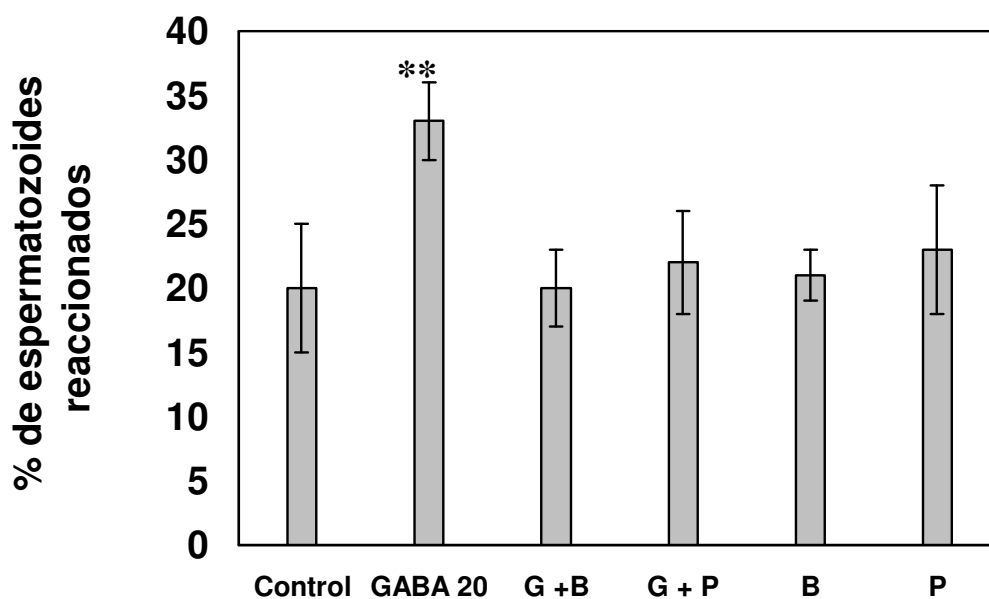


Figura 3. Efecto de los antagonistas bicuculina y picrotoxina sobre la reacción acrosómica de espermatozoides de carnero. Los espermatozoides fueron incubados durante 4 horas en medio BWW-m solo (Control), conteniendo GABA, uno de los antagonistas, o las combinaciones indicados, y posteriormente incubados en A23187 5μM durante 15 minutos. GABA 20: GABA 20 μM; B: bicuculina 1 μM; P: picrotoxina 1 μM. Las barras representan la Media ± D.S. para nueve eyaculados diferentes. \*\*P<0,001 vs Control.

Una tercera evidencia de la acción del GABA sobre la capacitación se obtuvo por incubación con el compuesto alopregnanolona. Este compuesto es un derivado de la progesterona que se halla presente en forma natural, y que potencia el efecto del GABA (es decir, lo hace más efectivo a bajas concentraciones), sin ejercer efecto en ausencia de GABA. Para dilucidar si este mecanismo opera en el espermatozoide, se realizaron incubaciones en presencia de GABA 1  $\mu$ M (es decir, una concentración que no alcanza a ser efectiva) junto a alopregnanolona. Como se observa en la Tabla V, esta baja concentración de GABA no fue efectiva para capacitar espermatozoides. En cambio, cuando el GABA 1  $\mu$ M se asoció a la alopregnanolona, se observó un claro efecto capacitante, indicativo de la acción potenciadora de este compuesto. El mismo efecto se observó cuando se estudió la reacción acrosómica (Figura 4).

Tabla V. Efecto del GABA y/o alopregnanolona sobre los estadios de capacitación de espermatozoides de carnero.

	Forma I (%)	Forma II (%)	Forma III (%)	Forma IV (%)	Viables (%)	Móviles (%)
Control	82 $\pm$ 4	11 $\pm$ 4	6 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	63 $\pm$ 7	64 $\pm$ 8
GABA 1 $\mu$ M	79 $\pm$ 8	15 $\pm$ 7	5 $\pm$ 2	1 $\pm$ 1	63 $\pm$ 6	65 $\pm$ 6
Alo 1 $\mu$ M	81 $\pm$ 5	12 $\pm$ 4	6 $\pm$ 2	1 $\pm$ 1	63 $\pm$ 7	63 $\pm$ 5
GABA + Alo	69 $\pm$ 5 <sup>a</sup>	16 $\pm$ 4	12 $\pm$ 3 <sup>b</sup>	3 $\pm$ 2	64 $\pm$ 5	62 $\pm$ 5
GABA 20 $\mu$ M	65 $\pm$ 12 <sup>b</sup>	22 $\pm$ 9 <sup>a</sup>	11 $\pm$ 4 <sup>a</sup>	2 $\pm$ 2	66 $\pm$ 6	66 $\pm$ 6

Los espermatozoides fueron incubados en medio BWW-m solo (Control) o conteniendo GABA 1 o 20  $\mu$ M, alopregnanolona (Alo) 1  $\mu$ M o en combinación de GABA 1  $\mu$ M + Alo 1  $\mu$ M. La capacitación fue evaluada por el porcentaje de Formas I a IV del patrón de marcación de CTC. Los resultados se expresan como Media  $\pm$  D.S. para ocho eyaculados diferentes. <sup>a</sup> p < 0,01; <sup>b</sup> p < 0,001 vs control.

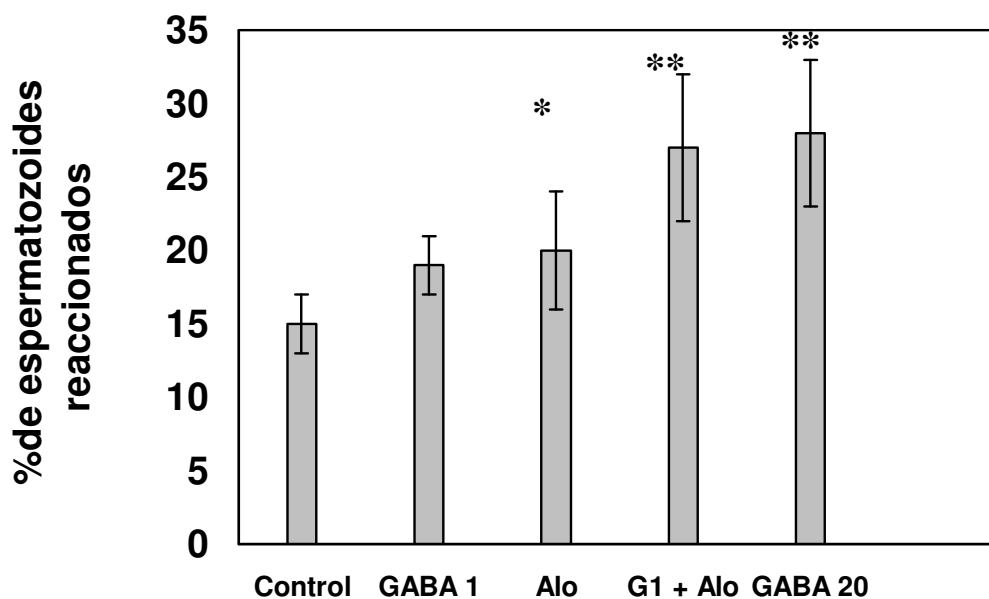


Figura 4. Efecto potenciador de la alopregnanolona sobre la reacción acrosómica de espermatozoides de carnero. Los espermatozoides fueron incubados durante 4 horas en medio BWW-m solo (Control), conteniendo GABA 1  $\mu\text{M}$  o 20  $\mu\text{M}$ , alopregnanolona (Alo), o una combinación GABA 1  $\mu\text{M}$  + Alo 1  $\mu\text{M}$ , y posteriormente incubados en A23187 5 $\mu\text{M}$  durante 15 minutos. GABA1: GABA 1  $\mu\text{M}$ ; GABA20: GABA 20  $\mu\text{M}$ ; Alo: alopregnanolona 1  $\mu\text{M}$ ; G1 + Alo: GABA 1  $\mu\text{M}$  + alopregnanolona 1  $\mu\text{M}$ . Las barras representan la Media  $\pm$  D.S. para ocho eyaculados diferentes. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,001$  vs Control

Una cuarta evidencia de la acción del GABA sobre la capacitación se obtuvo por incubación con dehidroepiandrosterona sulfato (DHEAS). La DHEAS es un neurotransmisor inhibitorio del GABA en el SNC. Se quiso saber si también inhibe la acción del GABA en el espermatozoide. Para ello, se realizó un ensayo en el que se usó como control la incubación en BWW-m. Al mismo tiempo se utilizaron 2 concentraciones de DHEAS (1 y 10  $\mu\text{M}$ ) y se analizó el efecto inhibitorio sobre la incubación con GABA 20  $\mu\text{M}$ . Adicionalmente se midió la viabilidad y motilidad de las muestras para descartar un efecto tóxico de estos compuestos. Los resultados se presentan en la Tabla VI.

Tabla VI. Efecto del GABA y DHEAS sobre los estadios de capacitación de espermatozoides de carnero.

	Forma I (%)	Forma II (%)	Forma III (%)	Forma IV (%)	Viables (%)	Móviles (%)
Control	13 ± 5	69 ± 3	15 ± 4 <sup>a</sup>	3 ± 1	60 ± 7	60 ± 6
GABA 20 µM	5 ± 2	61 ± 5	30 ± 6	4 ± 1	58 ± 4	57 ± 5
DHEAS 1 µM	8 ± 3	66 ± 7	23 ± 8	3 ± 2	56 ± 4	56 ± 5
DHEAS 10 µM	6 ± 3	74 ± 7	18 ± 5 <sup>a</sup>	2 ± 1	56 ± 3	56 ± 5
G + DHEAS 1 µM	7 ± 3	65 ± 12	25 ± 8	2 ± 2	55 ± 3	55 ± 7
G + DHEAS 10 µM	4 ± 2	73 ± 6	21 ± 6 <sup>b</sup>	2 ± 1	54 ± 2	54 ± 4

Los espermatozoides fueron incubados en medio BWW-m solo o conteniendo GABA 20 µM, dehidroepiandrosterona sulfato (DEHAS) 1 µM, DEHAS 10 µM, o dos combinaciones de GABA y DHEAS como se indica. La capacitación fue evaluada por el porcentaje de Formas I a IV del patrón de marcación de CTC. Los resultados se expresan como Media ± D.S. para doce eyaculados diferentes.  
<sup>a</sup> p < 0,001; <sup>b</sup> p < 0,05 vs GABA 20 µM.

De los resultados obtenidos se desprende que el efecto capacitante del GABA previamente observado es inhibido por DHEAS a una concentración 10 µM. Dosis más bajas de DHEAS (1 µM) carecen de efecto inhibitorio.

A fin de reforzar el concepto del papel del GABA en la capacitación, se realizaron experimentos análogos a los descritos determinándose la fosforilación en residuos tirosina por inmunofluorescencia. Para ello fue necesario poner a punto esta técnica en espermatozoides de carnero ya que no había sido descrita previamente en esta especie. En una primera serie de ensayos se determinó el patrón de marcación indirecta con el anticuerpo antifosfotirosina tanto en espermatozoides no capacitados (incubados en BWW-m, control negativo), como en espermatozoides capacitados (en BWW-m conteniendo BSA 4 mg/ml).

Los patrones de marcación encontrados fueron 4:

Patrón I: Marcación ecuatorial + flagelo

Patrón II: Marcación ecuatorial + acrosomal + flagelo

Patrón III: Marcación postacrosomal + flagelo

Patrón IV: Marcación completa de cabeza + flagelo

En la Figura 5 se observan los patrones más abundantes (I y II).

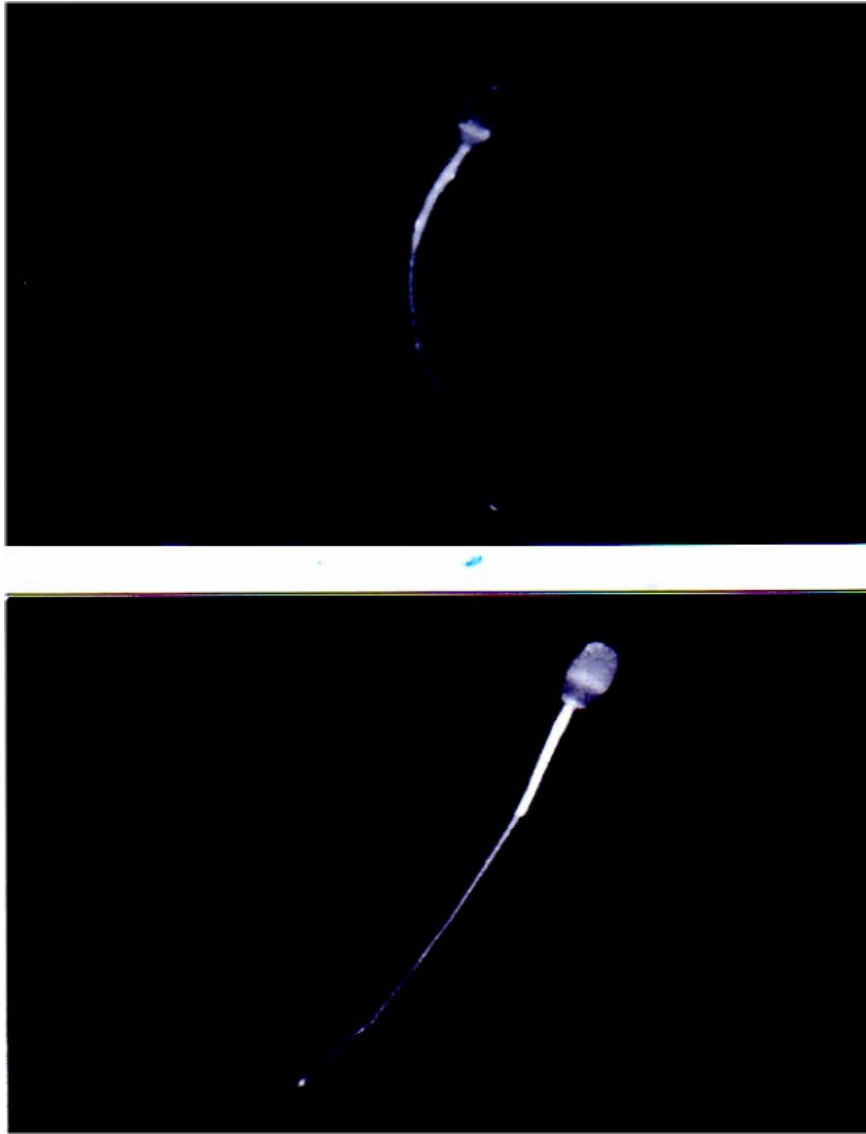


Figura 5. Patrones de marcación con el anticuerpo antifosfotirosina en espermatozoides de carnero. El patrón I presenta marca en el segmento ecuatorial y flagelo, y corresponde a espermatozoides no capacitados. El patrón II presenta marca en el segmento ecuatorial , acrosoma y flagelo, y corresponde a espermatozoides capacitados.

Los resultados obtenidos luego de la incubación fueron:

Tabla VII. Aparición de formas III de CTC y patrones de marcación para el anticuerpo antifosfotirosina en un medio control (BWW-m) o conteniendo BSA (4 mg/ml).

	Tiempo (h)	Patrón I (%)	Patrón II (%)	Patrón III (%)	Patrón IV (%)	CTC Forma III (%)
BWW-m	0	100 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	4 ± 2
	1	99,7 ± 0,3	0,3 ± 0,3	0 ± 0	0 ± 0	5 ± 1
	2	99,5 ± 0,5	0,5 ± 0,5	0 ± 0	0 ± 0	8 ± 1
	3	99,7 ± 0,3	0,3 ± 0,3	0 ± 0	0 ± 0	8 ± 2
	4	98,5 ± 1,4	1,6 ± 1,2	0 ± 0	0 ± 0	9 ± 2
BWW-m + BSA	1	89,1 ± 1,3	10,8 ± 2,7**	0 ± 0	0 ± 0	13 ± 2*
	2	83,6 ± 2,0*	16,3 ± 3,1**	0 ± 0	0,1 ± 0,1	22 ± 3**
	3	77,7 ± 2,1**	22,2 ± 3,1**	0,3 ± 0,3	0,1 ± 0,1	29 ± 3**
	4	75,1 ± 1,8**	24,6 ± 3,0**	0,3 ± 0,3	0 ± 0	33 ± 3**

Los espermatozoides fueron incubados en medio BWW-m sólo o conteniendo BSA (4 mg/ml). La fosforilación en proteínas fue evaluada por el porcentaje de Formas I a IV del patrón de marcación para el anticuerpo antifosfotirosina entre 1 y 4 horas de incubación. La capacitación fue evaluada por el porcentaje de Formas III del patrón de marcación de CTC. Los resultados se expresan como Media ± D.S. para cinco eyaculados diferentes. \* P<0,05, \*\* P<0,001 respecto a sus controles para un mismo tiempo de incubación.

El análisis de la Tabla VII muestra que el Patrón I de marcación antifosfotirosina se corresponde con el patrón que presentan los espermatozoides para la fosforilación en tirosina en condiciones no capacitantes. El uso de un medio conteniendo BSA (condiciones capacitantes) puso de manifiesto el aumento del Patrón II de marcación, concordando con lo obtenido para las Formas III de capacitación por CTC. Esto sugiere que la aparición del Patrón II de marcación para antifosfotirosina (marcación ecuatorial + acrosoma + flagelo) se corresponde con la capacitación de los espermatozoides.

Los Patrones III y IV se presentaron esporádicamente con el uso de ambos medios y no representaron un porcentaje mayor al 1% de los espermatozoides marcados en ningún caso, por lo que consideramos despreciable su incidencia y no se considerarán en los futuros ensayos.

Una vez determinado que el patrón II de fosforilación en tirosina es el que se corresponde con el estado capacitado determinado por CTC, se procedió a evaluar el

efecto del GABA sobre este parámetro. Para ello, se incubaron espermatozoides hasta 4 horas en medio BWW-m solo (no capacitante) o conteniendo GABA 20  $\mu$ M. Los resultados se muestran en la Tabla VIII.

Tabla VIII. Aparición de formas III de CTC y patrones de marcación para el anticuerpo antifosfotirosina en un medio control (BWW-m) o conteniendo GABA 20  $\mu$ M.

	Tiempo (h)	Patrón I (%)	Patrón II (%)	Patrón III (%)	Patrón IV (%)	CTC Forma III (%)
BWW-m	0	100 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	4 $\pm$ 2
	1	99,8 $\pm$ 0,3	0,2 $\pm$ 0,2	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	6 $\pm$ 1
	2	99,4 $\pm$ 0,5	0,6 $\pm$ 0,5	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	8 $\pm$ 1
	3	99,7 $\pm$ 0,3	0,3 $\pm$ 0,3	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	9 $\pm$ 2
	4	97,9 $\pm$ 1,6	3,1 $\pm$ 1,8	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	8 $\pm$ 2
BWW-m	1	100 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	4 $\pm$ 2
+ GABA	2	97,2 $\pm$ 1,2*	2,7 $\pm$ 1,0**	0 $\pm$ 0	0,1 $\pm$ 0,1	11 $\pm$ 2**
	3	95,2 $\pm$ 1,3**	4,6 $\pm$ 1,2**	0,3 $\pm$ 0,3	0,1 $\pm$ 0,1	15 $\pm$ 2**
	4	89,0 $\pm$ 3,1**	10,7 $\pm$ 3,0**	0,3 $\pm$ 0,3	0 $\pm$ 0	17 $\pm$ 2**

Los espermatozoides fueron incubados en medio BWW-m sólo o conteniendo BSA (4 mg/ml). La fosforilación en proteínas fue evaluada por el porcentaje de Formas I a IV del patrón de marcación para el anticuerpo antifosfotirosina entre 1 y 4 horas de incubación. La capacitación fue evaluada por el porcentaje de Formas III del patrón de marcación de CTC. Los resultados se expresan como Media  $\pm$  D.S. para cinco eyaculados diferentes. \* P<0,05, \*\* P<0,001 respecto a sus controles para un mismo tiempo de incubación.

En esta Tabla se aprecia que la incubación con GABA 20  $\mu$ M induce la aparición del patrón II de fosforilación en una fracción de los espermatozoides, observándose una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control a partir de las 2 horas de incubación.

Con el objeto de establecer la fosforilación de proteínas en residuos tirosina como posible mecanismo molecular involucrado en la capacitación de espermatozoides de carnero por GABA, se realizó el mismo estudio farmacológico utilizado previamente. Los resultados se presentan en las Tablas IX y X.

Tabla IX. Efecto del muscimol y baclofen sobre la capacitación de espermatozoides de carnero determinada por CTC y sobre el porcentaje de espermatozoides con Patrón II de marcación antifosfotirosina.

	Capacitación	Fosforilación
	Forma III	Patrón II
	CTC (%)	(%)
Control	7 ± 1	0,8 ± 0,5
GABA, 20 µM	15 ± 4*	13,6 ± 1,7*
Muscimol, 10 µM	16 ± 4*	6,9 ± 2,3*
Baclofen, 10 µM	8 ± 3	1,6 ± 0,8

Los espermatozoides fueron incubados en medio BWW-m sólo (Control) o conteniendo GABA o uno de los agonistas indicados. La capacitación fue evaluada por el porcentaje de Formas III del patrón de marcación de CTC y el grado de fosforilación por el porcentaje de espermatozoides con Patrón II de marcación para el anticuerpo antifosfotirosina. Los resultados se expresan como Media ± D.S. para cinco eyaculados diferentes. \* p < 0,01 vs control.

Tabla X. Efecto del GABA y antagonistas del receptor GABA<sub>A</sub> sobre la capacitación del espermatozoide de carnero determinada por CTC y sobre el porcentaje de espermatozoides con Patrón II de marcación antifosfotirosina.

	Capacitación	Fosforilación
	Forma III	Patrón II
	CTC (%)	(%)
Control	8 ± 3	1,4 ± 1,1
GABA 20 µM	14 ± 3*	10,5 ± 2,4**
G + B	7 ± 2	2,4 ± 0,7
G + P	8 ± 2	2,8 ± 2,0
Bicuculina 10 µM	7 ± 3	2,0 ± 0,5
Picrotoxina 10 µM	8 ± 2	2,0 ± 0,9

Los espermatozoides fueron incubados en medio BWW-m sólo (Control) o conteniendo 20 µM GABA (G), 10 µM bicuculina (B), 10 µM picrotoxina (P) o una combinación de GABA y uno de los antagonistas de GABA. La capacitación fue evaluada por el porcentaje de Formas III del patrón de marcación de CTC y el grado de fosforilación por el porcentaje de espermatozoides con Patrón II de marcación para el anticuerpo antifosfotirosina. Los resultados se expresan como Media ± D.S. para cinco eyaculados diferentes. \*p < 0,05; \*\*p < 0,001 vs control.



De acuerdo con los resultados obtenidos, el uso de muscimol a una concentración 10  $\mu\text{M}$  tuvo un efecto sobre el porcentaje de espermatozoides que presentaban fosforilación de proteínas acrosomales y del flagelo, similar al producido por el GABA a una concentración 20  $\mu\text{M}$ . En ambos casos, estos aumentos coinciden con el aumento en el porcentaje de espermatozoides capacitados evidenciado por el uso de CTC. En contraste, el baclofen 10  $\mu\text{M}$  no fue capaz de inducir un aumento en el porcentaje de espermatozoides fosforilados.

Como se observa en la Tabla X, la coincubación de espermatozoides con GABA y bicuculina o picrotoxina anuló completamente el efecto previamente observado en el porcentaje de espermatozoides marcados con el anticuerpo antifosfotirosina. Además, ninguna de las drogas tuvo algún efecto *per se*, sugiriendo que esta inhibición obedece a un bloqueo de la acción gabaérgica.

Una tercera evidencia de la acción del GABA sobre la capacitación y la concomitante fosforilación en residuos tirosina se obtuvo por incubación con el compuesto alopregnanolona. Para confirmar su efecto, y en función de su efecto particular sobre el GABA, se realizaron incubaciones en presencia de GABA 1  $\mu\text{M}$  (es decir, una concentración que no alcanza a ser efectiva) junto a alopregnanolona.

Como se observa en la Tabla XI, esta baja concentración de GABA no fue efectiva para capacitar espermatozoides ni para producir un aumento del porcentaje de espermatozoides con marcación antifosfotirosina respecto al control. En cambio, cuando el GABA 1  $\mu\text{M}$  se asoció a la alopregnanolona, se observó un claro efecto capacitante y asociado a esta capacitación un aumento significativo del porcentaje de espermatozoides reactivos al anticuerpo antifosfotirosina.

Tabla XI. Efecto del GABA y/o alopregnanolona la capacitación de espermatozoides de carnero determinada por CTC y sobre el porcentaje de espermatozoides con Patrón II de marcación antifosfotirosina.

	Capacitación	Fosforilación
	Forma III	Patrón II
	CTC (%)	(%)
Control	6 ± 1	0,6 ± 0,6
GABA 1 µM	6 ± 2	1,5 ± 0,9
GABA 20 µM	12 ± 4*	12,6 ± 4,9*
Alo 1 µM	6 ± 2	0,2 ± 0,4
GABA (1 µM) + Alo	13 ± 3**	7,0 ± 1,9*
GABA (20 µM) + Alo	16 ± 4**	12,6 ± 1,1*

Los espermatozoides fueron incubados en medio BWW-m sólo (Control) o conteniendo GABA 1 o 20 µM, alopregnanolona (Alo) 1 µM o una combinación de ambos como se indica. La capacitación fue evaluada por el porcentaje de Formas III del patrón de marcación de CTC y el grado de fosforilación por el porcentaje de espermatozoides con Patrón II de marcación para el anticuerpo antifosfotirosina. Los resultados se expresan como Media ± D.S. para cinco eyaculados diferentes. \*p < 0,01; \*\*p < 0,001 vs control.

Una cuarta evidencia de la acción del GABA sobre la capacitación y su posterior manifestación en la fosforilación de proteínas en residuos tirosina se obtuvo por incubación con dehidroepiandrosterona sulfato (DHEAS) (Tabla XII).

Tabla XII. Efecto del GABA y DHEAS sobre la capacitación de espermatozoides de carnero determinada por CTC y sobre el porcentaje de espermatozoides con Patrón II de marcación antifosfotirosina.

	Capacitación	Fosforilación
	Forma III	Patrón II
	(%)	(%)
Control	14 ± 3***	0,9 ± 0,9**
GABA 20 µM	32 ± 7	8,6 ± 1,3
DHEAS 10 µM	17 ± 5***	1,3 ± 1,0**
G + DHEAS 10 µM	20 ± 6*	3,1 ± 0,8*

Los espermatozoides fueron incubados en medio BWW-m sólo (Control negativo), conteniendo GABA 20 µM, dehidroepiandrosterona sulfato (DEHAS) 10 µM, o una combinación de GABA y DHEAS. La capacitación fue evaluada por el porcentaje de Formas III del patrón de marcación de CTC y el grado de

fosforilación por el porcentaje de espermatozoides con Patrón II de marcación para el anticuerpo antifosfotirosina. Los resultados se expresan como Media  $\pm$  D.S. para cinco eyaculados diferentes. \*\*\*p < 0,001; \*\*p < 0,01; \*p < 0,05 vs GABA 20  $\mu$ M.

El análisis de la Tabla XII nos indica que la DHEAS *per se* no indujo fosforilación en proteínas de espermatozoides pero inhibió parcialmente la acción del GABA 20  $\mu$ M, evidenciada tanto en el patrón de CTC como en el de fosfotirosina.

#### **8.4. DISCUSION**

Estos resultados demuestran que el GABA produce un efecto capacitante sobre los espermatozoides de carnero según lo que indica el aumento del porcentaje de espermatozoides con un patrón de unión de CTC compatible con un estado capacitado (Capítulo IV de esta Tesis). El efecto semejante al producido por el GABA que tiene el muscimol (un agonista del receptor GABA<sub>A</sub>), junto con la ausencia de efecto del baclofen (un agonista del receptor GABA<sub>B</sub>), y con la completa abolición del efecto del GABA por el uso de picrotoxina, bicuculina y DHEAS, y la potenciación por alopregnanolona, indican claramente que se encuentra involucrado un receptor GABA<sub>A</sub> clásico en este tipo de efecto. Estos resultados también indican que en el espermatozoide de carnero no está implicado un receptor GABA<sub>B</sub>, o al menos una entidad similar al receptor GABA<sub>B</sub> con respecto a su sensibilidad a la bicuculina.

El estudio de un posible papel del GABA en la función espermática se originó a partir de las altas concentraciones de este compuesto, usualmente considerado como un clásico neurotransmisor que actúa a nivel de la hendidura sináptica, encontradas en los tractos reproductivos femenino y masculino en otras especies. Las concentraciones altas de GABA encontradas en el oviducto (Erdö y col., 1982; Tanaka, 1985) indicarían un papel en el proceso de fecundación, actuando directamente sobre el oocito, sobre el espermatozoide o sobre ambos. Alternativamente, el GABA podría modular la contractilidad oviductal y uterina para facilitar el transporte espermático (Erdö y col., 1984a) o podría tener una función inmunomodulatoria (Petitto y col., 1990; Scatton y col., 1990). No obstante, la presencia de un receptor GABA inmunorreactivo (Wistrom y Meizel, 1993; Hu y col. 2002a,b; Ritta y col., 2004) y la presencia de un sitio de unión

del tipo GABA<sub>A</sub> (Erdö y Wekerle, 1990) en el espermatozoide sugiere una acción directa a este nivel.

Las concentraciones de GABA que producen un efecto capacitante *in vitro* son compatibles con las concentraciones presentes en el fluido oviductal ovino (ver Capítulo VI de esta Tesis), lo que apoya una base fisiológica para su acción. Adicionalmente, se debe tener en cuenta que *in vivo*, el efecto del GABA puede ser aumentado por compuestos que actúan sobre el receptor GABA<sub>A</sub>, tales como esteroides neuroactivos o compuestos endógenos con actividad benzodiazepina.

La progesterona y la 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona han sido identificadas como responsables de la reacción acrosómica inducida por el fluido folicular en humanos (Osman y col., 1989). Se sabe que la progesterona actúa a nivel de la membrana plasmática de los espermatozoides (Mendoza y col., 1995; Sabeur y col., 1996), pero la existencia de un receptor del tipo GABA<sub>A</sub> no está completamente aceptada debido a los requerimientos diferentes para la estimulación de la entrada de calcio y los correspondientes a la inducción de la reacción acrosómica (Blackmore y col., 1994; Turner y col., 1994). Kholkute y col. (1995) demostraron que la progesterona induce la reacción acrosómica y también incrementa el porcentaje de fecundación en el ratón. Interesantemente, en esta especie, el efecto de la progesterona sobre la reacción acrosómica de espermatozoides capacitados fue inhibida por bicuculina pero no por picrotoxina, sugiriendo que estaría involucrado un tipo particular de receptor GABA<sub>A</sub> (Shi y Roldan, 1995a). En ese mismo estudio, se demostró que el GABA indujo reacción acrosómica de espermatozoides capacitados en una manera dependiente de bicuculina y picrotoxina. En espermatozoides de cabrío, el uso de picrotoxina y bicuculina inhibieron la reacción acrosómica inducida por progesterona (Somanath y col., 2000; Somanath y Gandhi, 2002). En nuestro modelo, la progesterona no aceleró la capacitación, aún en presencia de GABA (datos no mostrados), mientras que la alopregnanolona claramente desarrolla un efecto potenciador (Tabla V y Figura 10).

Por otra parte, se ha sugerido que parecería no haber relación directa entre la capacidad de ciertos progestágenos para potenciar la acción del GABA sobre un receptor del tipo GABA<sub>A</sub> y su capacidad para inducir la reacción acrosómica en espermatozoides humanos (Erdö y Wekerle, 1990). Teniendo esto en cuenta, estos resultados nos llevan a proponer la hipótesis de que podrían coexistir un clásico receptor GABA<sub>A</sub> con un receptor GABA distinto, que presentan propiedades farmacológicas únicas, y que

podrían cumplir funciones diferentes en distintas etapas de la fecundación. Por otra parte, parecería también que habría diferencias entre especies. Así, está bien documentado que la combinación de diferentes formas de subunidades del receptor GABA<sub>A</sub> determinan la sensibilidad del complejo supramolecular a los diferentes agonistas y antagonistas (Mihic y col., 1995; Mehta y Ticku, 1999; Smith y col., 2001). Los recientes descubrimientos de la acción del GABA a nivel del espermatozoide requieren estudios más detallados sobre la caracterización molecular y las propiedades farmacológicas del receptor involucrado en la regulación de la función espermática.

Los experimentos llevados a cabo en este capítulo nos indican que el porcentaje de espermatozoides que alcanza la forma III de CTC por la acción del GABA nunca excede el 20%, sugiriendo que sólo una pequeña subpoblación de los espermatozoides en una muestra de semen es capaz de responder al GABA. Comparativamente, cerca del 70% de los espermatozoides de los mismos carneros, obtenidos en la misma época, exhibieron un patrón III de CTC después de la incubación con fluido oviductal sintético conteniendo suero (Capítulo IV de esta Tesis). La baja respuesta al GABA es apoyada por Wistrom y Meizel (1993), quienes demostraron que en el semen humano, sólo una subpoblación (aproximadamente la mitad) de los espermatozoides fueron positivos a la marcación inmunofluorescente con un anticuerpo monoclonal contra la subunidad  $\alpha$  del receptor GABA<sub>A</sub>. No obstante, existe la posibilidad de que *in vivo*, moduladores endógenos de la acción del GABA a nivel del receptor GABA<sub>A</sub> (tales como benzodiazepinas endógenas o metabolitos de la progesterona) podrían contribuir a aumentar la eficacia del GABA en la capacitación de los espermatozoides. En contraposición a estos resultados, Zhang y col. (2000), utilizando 5  $\mu$ M de GABA en espermatozoides humanos, obtuvieron capacitación de un 65,9 % de los espermatozoides luego de 2 horas de capacitación (37,3 % en el control) según CTC.

La fosforilación de proteínas estructurales y reguladoras es el mecanismo de control intracelular más importante en eucariotas (Johnson y Barford, 1993; Pawson, 1995). El estudio de la fosforilación en tirosina de proteínas del espermatozoide es de gran interés, ya que ha sido sugerido como un indicador de cambios intracelulares que preceden y/o están asociados con la capacitación en diversas especies de mamíferos (Visconti y col., 1995a,b; Galantino-Homer y col., 1997; Kalab y col., 1998; Osheroff y col., 1999). Se ha postulado, que las proteínas fosforiladas en tirosina iniciarían la unión (“binding”) a

la zona pelúcida (Sakkas y col., 2003; Asquith y col., 2004; Liu y col., 2006) y que inducirían la reacción acrosómica (Naz, 1996; Pukazhenthil y col., 1996b).

Leyton y Saling en 1989(a) fueron los primeros investigadores en estudiar la fosforilación en residuos tirosina en espermatozoides de ratón durante la capacitación. En 1995(a,b), Visconti y colaboradores, continuando los trabajos de Duncan y Fraser (1993), demostraron que las condiciones que llevan a la capacitación de espermatozoides del epidídimo caudal de ratón promueven la fosforilación de residuos tirosina de una serie de proteínas de entre 40 kDa-120 kDa. Este incremento de la fosforilación en tirosina mostró ser dependiente de la presencia de albúmina,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{NaHCO}_3$  en el medio y la concentración necesaria de estos componentes para que ocurra fosforilación de residuos tirosina de proteínas está correlacionada con las necesitadas para la capacitación (Visconti y col., 1995a). Específicamente, la ausencia de algunos de estos constituyentes del medio evitan que ocurra la fosforilación de residuos tirosina de proteínas y la capacitación de espermatozoides del epidídimo caudal de ratón. En 1997, Emiliozzi y Fenichel demostraron que la albúmina es necesaria tanto para la fosforilación en tirosina como para la capacitación de espermatozoides humanos y que actúa de manera dependiente de la concentración.

Como se dijo antes, la fosforilación de proteínas en tirosina no ocurre cuando los espermatozoides de ratón se incuban en ausencia de BSA,  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{NaHCO}_3$  (Visconti y Kopf, 1998), en ausencia de BSA y  $\text{NaHCO}_3$  en espermatozoides humanos (Osheroff y col., 1999) o en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en espermatozoides de cerdo (Dube y col., 2003; Tardif y col., 2003).

Cuando los espermatozoides de ratón o humano se incuban en ausencia de BSA y  $\text{NaHCO}_3$ , pero en presencia de agonistas de AMPc, se recupera el aumento de fosforilación en tirosina de proteínas y la capacitación (Visconti y col., 1995b; Osheroff y col., 1999). Más aún, la fosforilación de proteínas en tirosina es acelerada por agonistas activos del AMPc en medios completos que producen capacitación. Estas observaciones llevan a dos conclusiones principales. La primera es que la acción del AMPc parece estar etapas abajo de las acciones de la BSA,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{NaHCO}_3$  y etapas arriba de la fosforilación en tirosina de proteínas. La segunda es que los resultados también sugieren que la fosforilación de proteínas en tirosina y la capacitación están regulados a través de un paso que involucra a la PKA (proteínquinasa dependiente de AMPc).

En el caso de espermatozoides humanos, Osheroff y col. (1999) demostraron que el sitio de acción del  $\text{NaHCO}_3$  está etapas debajo de la acción de la BSA. Esta misma conclusión es apoyada por los trabajos realizados por Visconti y col. (1999) en espermatozoides de ratón.

Se puede especular que la remoción del colesterol, con el resultante cambio en la fluidez de la membrana plasmática del espermatozoide, podría modular los flujos de iones  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{HCO}_3^-$  que llevan a la activación de la adenilato ciclasa. Sin embargo, esta hipótesis debe ser aún verificada.

En conjunto, estos datos sugieren que la fosforilación de proteínas en tirosina y la capacitación parecerían estar bajo la regulación de un camino que involucra a la PKA/AMPc (Visconti y Kopf, 1998; Pommer y col., 2003; Hess y col., 2005).

En nuestro caso, la incubación de espermatozoides de carnero en presencia de GABA 20  $\mu\text{M}$  indujo la fosforilación de proteínas en residuos tirosina en la región acrosomal de una subpoblación de la muestra. Dada la presencia, en espermatozoides no capacitados, de fosfotirosina en el segmento ecuatorial y el flagelo de espermatozoides no capacitados, no fue posible evaluar los cambios en dichas regiones por la técnica utilizada, en la forma en que fue descrita por diversos autores (Kaneto y col., 2002; Pérez-Pé y col., 2002; Dube y col., 2003; Tardif y col., 2003). No obstante ello, la aparición de marca en la región acrosomal en condiciones capacitantes sugiere que la fosforilación de la región acrosomal podría utilizarse como un marcador sensible de la capacitación.

Como conclusión, el conjunto de los resultados presentados en este capítulo indican que el GABA produce un efecto capacitante *in vitro* sobre los espermatozoides de carnero, evaluado por el aumento del porcentaje de espermatozoides con un patrón de unión de CTC compatible con un estado capacitado. Además, el efecto del GABA estaría mediado por su interacción con un receptor  $\text{GABA}_A$  clásico, según lo demuestran los estudios de farmacología aquí presentados.

## **9. CAPITULO VI: Evidencia del papel del GABA oviductal en la capacitación de espermatozoides de carnero**

### **9.1 INTRODUCCION**

A pesar de que el mecanismo preciso involucrado en la capacitación espermática no está totalmente caracterizado, es evidente que una serie de compuestos presentes en las secreciones del tracto reproductivo femenino contribuyen a la capacitación espermática. De todos modos, la naturaleza exacta de estos compuestos que actuarían en conjunto para llevar adelante una capacitación exitosa no ha sido completamente identificada.

En el capítulo anterior, hemos descripto fuerte evidencia de que el GABA induce la capacitación *in vitro* en una subpoblación de espermatozoides de carnero en un medio químicamente definido, efecto que fue mimetizado por el muscimol, que es un agonista del receptor GABA<sub>A</sub>, pero no por el baclofen, que es un agonista del receptor GABA<sub>B</sub>. Por otra parte, la bicuculina y la picrotoxina, ambos antagonistas del receptor GABA<sub>A</sub>, inhibieron completamente el efecto capacitante del GABA. Adicionalmente, el efecto del GABA fue potenciado por el neuroesteroide alopregnanolona, que se sabe que modula positivamente el receptor GABA<sub>A</sub> en el Sistema Nervioso Central (Majewska y col., 1986; Paul y Purdy, 1992; Robel y Baulieu, 1994; Lambert y col., 1995). Considerando todo en su conjunto, estos datos sugieren que en el efecto capacitante del GABA en el espermatozoide de carnero estaría involucrado un receptor GABA del tipo A.

Con la intención de encontrar un vínculo fisiológico entre el efecto del GABA en la capacitación de los espermatozoides (ya descripto en el capítulo V) y la presencia de GABA en el tracto reproductivo femenino, decidimos llevar adelante una serie de estudios con los siguientes objetivos: 1) determinar la presencia de GABA en el fluido oviductal de la oveja, 2) determinar la capacidad de estos fluidos para llevar adelante la capacitación *in vitro* de espermatozoides de carnero, así como evaluar la sensibilidad de dicho fluido a los antagonistas clásicos del receptor GABA<sub>A</sub>, y 3) analizar la posible presencia de un receptor del tipo GABA<sub>A</sub> en el espermatozoide de carnero.



## **9.2 METODOS**

### **9.2.1. Muestras**

Las muestras de semen fueron colectadas y evaluadas según se explicara en Materiales y Métodos Generales.

El fluido oviductal fue colectado de ovejas canuladas quirúrgicamente. Los animales fueron sincronizados para el estro por medio de esponjas intravaginales conteniendo 60 mg de acetato de medroxiprogesterona, colocadas durante 14 días. Al momento de la extracción de la esponja, los animales fueron inyectados en forma intramuscular con 200 UI de gonadotrofina sérica de yegua preñada (PMSG) (Laboratorios Syntex, Buenos Aires, Argentina), y se siguió la aparición de estro cada 12 horas utilizando carneros vasectomizados pintados en el pecho, para marcar a las hembras que entraban en celo. Una vez que presentaron celo, las ovejas fueron separadas y se procedió a la canulación oviductal. Para este propósito, los animales fueron anestesiados con 0,3 ml de sulfato de atropina 1% (peso/volumen) en forma intramuscular y 0,7 ml de xylazina 2% (peso/volumen), seguido, después de 15 minutos, de 1,5 ml de clorhidrato de ketamina 50 mg/ml y se le insertó una cánula de 2 mm en cada oviducto. Los animales fueron luego mantenidos individualmente a puertas cerradas con acceso libre a agua y heno de alfalfa. Luego de la recuperación (usualmente 1 día), el fluido fue colectado durante 24 horas en viales plásticos unidos a la cánula, y congelados a -70°C hasta ser utilizado en incubaciones con espermatozoides o bien utilizados para determinar el contenido de GABA, lo que fue realizado dentro de los 30 días. Después de descongelado, una alícuota de cada muestra fue desproteinizada por ultracentrifugación (5000-Da punto de corte; Lida Manufacturing Corp, Kenosha, WI, USA). De ahora en adelante nos referiremos a estas alícuotas como fluido oviductal filtrado (FOF). El resto de la muestra no fue desproteinizado y nos referiremos a esta fracción como fluido oviductal completo (FOC).

### **9.2.2. Capacitación *in vitro***

Inmediatamente después de colectado y evaluado, alícuotas de 100 µl de semen fueron lavadas una vez en 8 ml de medio Biggers, Whitten y Wittingham (BWW) (Biggers y col., 1971) sin BSA o suero, suplementado con Hepes 10 µM y ajustado a un pH de 7.4 con NaOH 0,1 N, en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> (BWW-m). Las suspensiones de

espermatozoides fueron centrifugadas en tubos plásticos cónicos de 15 ml a 500xg durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sedimento obtenido se resuspendió en BWW-m hasta llevarlo a una concentración de  $10^8$  espermatozoides/ml. Una alícuota de 50  $\mu$ l de esta suspensión fue llevada a un volumen final de 100  $\mu$ l, con 25  $\mu$ l de FOF o de FOC y en presencia o ausencia de bicuculina (1  $\mu$ M) o picrotoxina (1  $\mu$ M). La incubación se llevó a cabo en cajas de 96 pozos, en el interior de una estufa humidificada a 38°C de temperatura y bajo una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> en aire. Después de 4 horas, se tomaron alícuotas de cada muestra y se evaluó el grado de capacitación por medio del ensayo de unión de clortetraciclina.

### **9.2.3. Evaluación de la capacitación por unión de CTC**

La evaluación se realizó según lo descrito en el capítulo IV de esta Tesis. En todos los casos, las muestras fueron procesadas por duplicado, y al menos 150 espermatozoides fueron analizados por portaobjetos. No se observó fluorescencia cuando la CTC fue omitida de las preparaciones.

### **9.2.4. Determinación de GABA por HPLC**

Muestras de 10  $\mu$ l de fluido oviductal desproteinizado o de un patrón (standard) de GABA fueron conjugados con o-ftadialdehído (Schuster, 1987) y se evaluó el contenido de GABA por HPLC de fase reversa, utilizando un cromatógrafo Hewlett-Packard 1050 (Hewlett-Packard Argentina) con detector de fluorescencia. Con este propósito, se inyectaron 50  $\mu$ l de muestras conjugadas en una columna Aminoquant (Hewlett-Packard Argentina) y corridas en metanol:acetato de sodio (19:81 v/v), pH 7,0 a 0,35 ml/ml a 50°C. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 230 nm y 455 nm, respectivamente. Bajo estas condiciones, el tiempo de retención para el GABA fue de 29 minutos.

### **9.2.5. Desplazamiento de <sup>3</sup>H-muscimol por fluido oviductal en un ensayo de radioreceptor (RR)**

Este método se basa en la inhibición competitiva de la unión de [<sup>3</sup>H]-muscimol al receptor GABA<sub>A</sub> de membranas cerebelares de rata por el GABA presente en la muestra.

Se utilizó una modificación del método descrito por Bernasconi y col. (1980) y Ritta y col. (1987,1998). Se incubaron alícuotas de 100  $\mu$ l de una preparación de membranas cerebelares de rata crudas (aproximadamente 400  $\mu$ g de proteína) en buffer Tris-citrato 50 mM, pH 7,2, con 300  $\mu$ l de muestra o un standard de GABA a diferentes concentraciones, disuelto en buffer Hepes-Tris. Se agregaron 100  $\mu$ l de ( $^3$ H)-muscimol en buffer Tris-citrato hasta obtener una concentración final de 5 nM. La unión no específica se determinó en incubaciones en paralelo conteniendo 200  $\mu$ M de GABA. Las muestras (por triplicado) fueron incubadas durante 10 minutos a 22°C y centrifugadas a 20000xg durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue descartado y el sedimento se lavó dos veces con 3 ml de buffer Tris-citrato frío. Después de la digestión del precipitado con clorhidrato de hyamina, se agregó una solución centellante con Triton X-114 y la radioactividad fue contada en un espectrómetro de centelleo líquido. El rango de detección para el GABA fue de 2,5-100 pmoles. Los coeficientes de variación intraensayo e interensayo fueron 5 y 20%, respectivamente. Con el objeto de determinar si el desplazamiento del ( $^3$ H)-muscimol de sus sitios de unión fue debido a GABA auténtico, antes del ensayo las muestras fueron incubadas con GABAasa, el sistema enzimático de degradación de GABA altamente específico (Graham y Aprison, 1966). El desplazamiento de  $^3$ H-muscimol fue inhibido en un 85% por pre-tratamiento con GABAasa.

#### **9.2.6. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) y transferencia de bandas y detección con anticuerpo (immunoblots)**

Después del lavado en PBS, el sedimento de espermatozoides fue diluído, en la relación 4:1 (v:v) con un buffer a una concentración 5 veces la concentración final deseada, la cual fue SDS 2%, glicerol 10%, Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8; sin agentes reductores de disulfuro. Las células fueron lisadas por sonicación dos veces durante 15 segundos con un sonicador Fisher Sonic Dismembrator Modelo 300 (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA). Las proteínas fueron extraídas por calentamiento a 95°C durante 6 minutos dos veces. Los extractos fueron centrifugados a 12000 x g durante 10 minutos, se le adicionó 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol, se hirvieron durante 3 minutos y fueron usados inmediatamente o bien almacenados a -20 °C. Las proteínas fueron separadas sobre láminas gruesas de geles de poliacrilamida 10%, según lo descrito por Laemmli (1970) y teñidos con azul de Coomassie para confirmar carga proteica equivalente o

transferidos a membranas Immobilon-P (Millipore Corp., Bedford, MA, USA) de 0,45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro (Towbin y col., 1979). Después de la transferencia, las membranas fueron bloqueadas por incubación durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución de gelatina 3%, leche 0,5% disuelta en buffer de lavado (consistente en TrisHCl 50 mM, pH 7,6, NaCl 100 mM, Tween-20 0,1%, gelatina 0,2%). Los blots fueron incubados con anticuerpo monoclonal anticadena  $\alpha$  del receptor GABA<sub>A</sub> en una concentración de 0,5  $\mu\text{g/ml}$  en solución de bloqueo durante una noche a 4°C. Se utilizó como anticuerpo secundario un anti IgG de ratón producido en cabra y conjugado con peroxidasa de rábano en una concentración de 0,5 g/ml, incubándose durante 60 minutos. El exceso del primer y segundo anticuerpo fue removido por 5 lavados de 10 minutos cada uno con buffer de lavado. La detección fue realizada con un sistema mejorador de quimioluminiscencia (ECL, Amersham Life Science, Arlington Heights, IL, USA) y la posterior exposición a película fotográfica Kodak XAR.

#### **9.2.7. Análisis estadísticos**

Se realizaron utilizando un Análisis de Varianza (ANOVA) y un test de comparaciones múltiples Tukey-Kramer, luego de la transformación angular de los datos (Steel y Torrie, 1981).

### **9.3 RESULTADOS**

El fluído oviductal de ovejas durante el período de estro mostró tener una concentración significativa de GABA, de acuerdo a las determinaciones realizadas por dos métodos independientes:  $(2,9 \pm 0,3) \mu\text{M}$  por HPLC y  $(1,7 \pm 0,4) \mu\text{M}$  por RR (media  $\pm$  Desvío standard, n=12). Los intervalos de confianza del 95% fueron  $(2,2 \mu\text{M}-3,7 \mu\text{M})$  y  $(0,8 \mu\text{M}-2,4 \mu\text{M})$  por HPLC y RR, respectivamente.

La Tabla I muestra el efecto de la incubación con fluído oviductal filtrado (FOF) sobre la capacitación de los espermatozoides de carnero, y la inhibición de este efecto por el uso de antagonistas del receptor GABA<sub>A</sub>, como la bicuculina y la picrotoxina. Antes de la incubación, la mayoría de los espermatozoides (79,4 %) estaban en la Forma I, que se considera estado no capacitado. La incubación durante 4 horas con FOF llevó a un incremento significativo respecto del control, en el porcentaje de espermatozoides que mostraban la Forma III de CTC, considerada como un estado capacitado. La

coincubación con bicuculina y picrotoxina anuló el efecto del FOF, dando como resultado valores que no difieren significativamente de los controles. El resultado del porcentaje de espermatozoides con acrosoma reaccionado (Forma IV de CTC) no se vio afectado por ninguno de los tratamientos.

Tabla I. Efecto del fluido oviductal filtrado sobre la capacitación de espermatozoides de carnero, y antagonismo por el uso de bicuculina y picrotoxina (N=12).

T (h)	Incubación	Forma I (%)	Forma II (%)	Forma III (%)	Forma IV (%)
0	-	79,4 ± 5,3 <sup>a</sup>	12,3 ± 4,3 <sup>a</sup>	5,7 ± 2,9 <sup>a</sup>	2,6 ± 0,9
4	C	7,0 ± 4,6 <sup>b</sup>	81,2 ± 5,4 <sup>b</sup>	9,4 ± 3,7 <sup>ab</sup>	2,4 ± 1,0
4	B	8,9 ± 6,5 <sup>b</sup>	81,1 ± 5,6 <sup>bc</sup>	7,7 ± 2,1 <sup>acd</sup>	2,4 ± 0,9
4	P	8,9 ± 4,7 <sup>b</sup>	79,6 ± 6,7 <sup>bc</sup>	9,8 ± 3,4 <sup>bce</sup>	1,8 ± 1,3
4	FOF	5,6 ± 4,3 <sup>b</sup>	72,0 ± 3,9 <sup>d</sup>	19,1 ± 0,7 <sup>f</sup>	3,3 ± 1,1
4	FOF + B	6,8 ± 2,4 <sup>b</sup>	78,8 ± 4,5 <sup>bd</sup>	12,0 ± 3,3 <sup>bd</sup>	2,4 ± 0,6
4	FOF + P	5,9 ± 3,6 <sup>b</sup>	79,2 ± 4,3 <sup>bd</sup>	12,6 ± 3,5 <sup>b</sup>	2,4 ± 0,8

Los espermatozoides fueron incubados con fluido oviductal filtrado (FOF), en presencia o ausencia de bicuculina 1 μM (B) o picrotoxina 1 μM (P), y evaluados por el patrón de distribución de CTC. C: control (medio BWW). Los valores con diferentes supraíndices entre filas difieren significativamente (p < 0,05).

La Tabla II muestra el efecto de la incubación con fluido oviductal completo (sin filtrar) sobre la capacitación de los espermatozoides de carnero, y la ausencia de inhibición de este efecto por el uso de antagonistas del receptor GABA<sub>A</sub>, como la bicuculina y la picrotoxina. La incubación durante 4 horas con FOC llevó a un incremento significativo respecto del control, en el porcentaje de espermatozoides que mostraban la Forma III de CTC, considerada como un estado capacitado. La coincubación con bicuculina y picrotoxina no afectó el efecto del FOC.

Tabla II. Efecto del fluido oviductal completo sobre la capacitación de espermatozoides de carnero, y antagonismo por el uso de bicuculina y picrotoxina (N=12).

T (h)	Incubación	Forma I (%)	Forma II (%)	Forma III (%)	Forma IV (%)
0	-	77,4 ± 4,8 <sup>a</sup>	13,4 ± 5,2 <sup>a</sup>	5,2 ± 2,7 <sup>a</sup>	3,5 ± 1,3 <sup>a</sup>
4	C	6,7 ± 4,0 <sup>b</sup>	79,5 ± 6,4 <sup>b</sup>	10,1 ± 3,9 <sup>ab</sup>	3,4 ± 1,6 <sup>a</sup>
4	B	8,5 ± 6,2 <sup>b</sup>	82,7 ± 6,3 <sup>bc</sup>	7,0 ± 2,4 <sup>ab</sup>	3,7 ± 1,4 <sup>a</sup>
4	P	9,3 ± 5,7 <sup>b</sup>	80,5 ± 7,1 <sup>bc</sup>	10,0 ± 3,8 <sup>ab</sup>	2,4 ± 2,3 <sup>a</sup>
4	FOC	0,4 ± 0,4 <sup>c</sup>	21,0 ± 9,5 <sup>d</sup>	72,6 ± 8,5 <sup>c</sup>	6,1 ± 1,7 <sup>b</sup>
4	FOC + B	0,3 ± 0,3 <sup>c</sup>	24,8 ± 11,2 <sup>d</sup>	69,1 ± 11,2 <sup>c</sup>	5,9 ± 1,9 <sup>ab</sup>
4	FOC + P	0,5 ± 0,5 <sup>c</sup>	24,1 ± 13,0 <sup>d</sup>	71,2 ± 12,8 <sup>c</sup>	4,2 ± 1,7 <sup>ab</sup>

Los espermatozoides fueron incubados con fluido oviductal completo (FOC), en presencia o ausencia de bicuculina 1  $\mu$ M (B) o picrotoxina 1  $\mu$ M (P), y evaluados por el patrón de distribución de CTC. C: control (medio BWW). Los valores con diferentes supraíndices entre filas difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

El uso de anticuerpo monoclonal anti cadena  $\alpha$  del receptor GABA<sub>A</sub> de cerebro bovino nos permitió detectar por electroforesis de extractos proteicos de espermatozoides de carnero una banda mayoritaria de 52 kDa por medio de una transferencia Western (Figura 2), sugiriendo que formas relacionadas (si no idénticas) están presentes en estos tejidos.

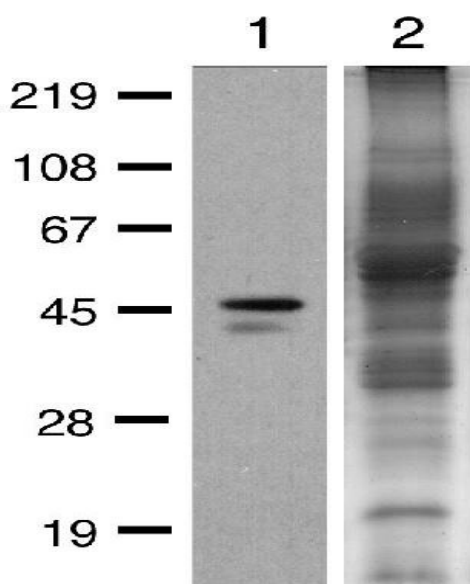


Figura 2. Análisis de inmunoblot para la subunidad  $\alpha$  del receptor GABA<sub>A</sub> en espermatozoides de carnero. Se analizaron 36  $\mu$ g de proteína sobre Western blot usando como sonda la línea celular bd24. El peso molecular de los marcadores ( $\times 10^{-3}$ ) está indicado a la izquierda de la calle 1. Calle 1: Western blot. Calle 2: Perfil proteico por tinción con azul de Coomassie. Estos experimentos fueron repetidos tres veces con resultados idénticos.

#### 9.4. DISCUSION

Este estudio muestra que el GABA está presente en el oviducto de la oveja durante el período del estro, y que éste es capaz de inducir capacitación en una fracción de espermatozoides por un mecanismo que involucra a un receptor GABA<sub>A</sub>. La aparición de especies moleculares que reaccionan con un anticuerpo anticadena  $\alpha$  del receptor GABA<sub>A</sub> apoya esta idea.

Para la determinación del GABA en las muestras se utilizaron como metodologías HPLC y ensayo de RR (Bernasconi y col., 1980; Mousah y col., 1987; Ritta y Calandra, 1986; Schuster, 1988). A pesar de que los valores encontrados por HPLC son algo más altos que los detectados por RR, los intervalos de confianza mostraron que eran significativamente diferentes de cero en ambos casos. Además, los valores obtenidos están en el rango micromolar, lo que es consistente con el efecto descrito del GABA sobre la capacitación de espermatozoides (Capítulo V, de esta tesis). Sin embargo, en

este estudio, la respuesta obtenida con 1-5  $\mu\text{M}$  de GABA puro, por ejemplo, que es el rango de concentración del GABA encontrado en el FOF, fue más bajo que la respuesta sensible a picrotoxina y bicuculina del FOF. Así, es posible que compuestos de bajo peso molecular actúen como moduladores positivos del receptor  $\text{GABA}_A$ . Por ejemplo, en el fluido oviductal podrían estar también presentes neuroesteroides y benzodiazepinas endógenas.

El uso de anticuerpo monoclonal bd24 antisubunidad  $\alpha$  del receptor  $\text{GABA}_A$  en los análisis de inmunoblot standard detectó una banda proteica mayoritaria con un peso molecular aparente de 52 kDa (como ha sido reportado en otros tipos celulares), así como una proteína menor de 46 kDa. En contraste a una observación hecha por Wistrom y Meizel (1993) cuando utilizaron el mismo anticuerpo monoclonal en humanos, no hemos detectado reactividad en relación a una proteína de 75 kDa (no reportada en otros tipos celulares). Tampoco encontramos ninguna banda menor con peso molecular entre 50 y 75 kDa que estos autores reportaron. Con relación a la existencia de receptores  $\text{GABA}_A$ , estos fueron identificados por Wistrom y Meizel (1993) en espermatozoides humanos por inmunofluorescencia, y por Erdö y Wekerle (1990) en espermatozoides de carnero y cerdo por métodos bioquímicos. También He y col. (2003) encontraron inmunomarcación antireceptor  $\text{GABA}_A$  en espermatozoide de rata, aunque es importante señalar que estos autores identificaron tanto receptores  $\text{GABA}_A$  como  $\text{GABA}_B$ . En los espermatozoides de carnero, sólo estarían involucrados receptores de tipo  $\text{GABA}_A$  (ver estudios farmacológicos presentados en el Capítulo V de esta Tesis)

Debido a que las enzimas necesarias para la síntesis de GABA no fueron medidas en este estudio, el origen o los orígenes del GABA en espermatozoides todavía debe ser investigado. Así, el GABA podría ser sintetizado localmente en los espermatozoides o bien, como lo sugieren Aanesen y col. (1995,1996) para espermatozoides humanos, que existiera un mecanismo de captación de GABA mediado por una proteína transportadora específica, cuya fisiología está en discusión.

Se debe tener en cuenta que se usó para las incubaciones espermáticas la fracción de bajo peso molecular ( $< 5000$  Da) del fluido oviductal. De hecho, la incubación en presencia del fluido oviductal completo indujo capacitación de más del 65 % de los espermatozoides de carnero. El efecto capacitante del fluido oviductal completo, o el de un medio condicionado de células oviductales fue previamente descrito en bovinos



(Mc Nutt y Killian, 1989,1991; Parrish y col., 1989,1994; King y col., 1994; Chian y col., 1995; Mahmoud y Parrish, 1996; Topper y col., 1999), ovinos (Chavarria y Reyes, 1996), porcinos (Kim y col., 1997) caninos (Kawakami y col., 1998) y humanos (Yao y col., 1999). El efecto beneficioso de la interacción entre los espermatozoides y las células epiteliales oviductales también fue demostrado (por referencias, ver Smith, 1998; Suarez, 1998). La unión de los espermatozoides a las células oviductales aumenta su vida media en algunas especies (Smith y Yanagimachi, 1990; Pollard y col., 1991; Lapointe y Sirard, 1996; Boquest y col., 1999). Esta interacción compleja de los espermatozoides con las células oviductales, que retrasa la capacitación, y con sus secreciones, que promueven la capacitación, es probablemente la que regula el número de espermatozoides capacitados que llegan al sitio de fecundación cerca del momento de la ovulación.

Hasta el presente, no se sabe en qué estado del proceso de fecundación actúa el GABA sobre los espermatozoides. El GABA está presente en los órganos reproductivos de los machos en las ratas (Bowery y col., 1981; Erdö y col., 1983; Ritta y Calandra, 1986) y se han encontrado altas concentraciones de GABA en el plasma seminal humano (Leader y col., 1992; Ritta y col., 1998). Así, es de esperar que el efecto del GABA sobre los espermatozoides ocurra dentro del tracto reproductivo masculino o bien inmediatamente después de la eyaculación. De todos modos, hasta ahora hay pocas evidencias experimentales que apoyen este hecho. Sin embargo, bajo condiciones fisiológicas, la ocupación de receptores GABA<sub>A</sub> específicos en espermatozoides podría ocurrir a este nivel. Sólo la reacción acrosómica inducida por GABA fue demostrada en espermatozoides previamente capacitados de ratón (Roldan y col., 1994; Shi y Roldan; 1995a; Murase y Roldan; 1996; Espinoza y col., 1998), de cobayo (Shi y col., 1996; Yuan y col., 1999; Zhang y col., 2000), de musaraña (Cao y col., 1997), de rata (Hu y col., 2002b) y de humanos (Wistrom y Meizel, 1993; Hall y col., 1996; Shi y col., 1997; Yuan y col., 1998; Calogero y col., 1999; Zhang y col., 2000). En nuestras condiciones (capítulo V de esta Tesis y resultados aquí expuestos), el GABA puro y el GABA oviductal fueron incapaces de inducir reacción acrosómica, probablemente debido a diferencias entre especies o a las diferentes condiciones de incubación. Sin embargo, es posible que *in vivo*, el GABA pueda actuar tanto sobre la capacitación como sobre la reacción acrosómica, dependiendo del estado de capacitación individual de los espermatozoides.

Por otra parte, hay evidencias que apoyan un efecto del GABA en el tracto reproductivo femenino. Utilizando un modelo *in vitro*, se ha demostrado en el oviducto de rata que ocurre una liberación de GABA no neural (Forray y col., 1993), y que el GABA afecta la actividad contráctil de la trompa de Falopio humana, y podría también afectar el transporte del oocito, a través de un mecanismo que involucra receptores GABA<sub>B</sub> (Lazlo y col., 1990). De esta manera, parecería que el GABA, que estaría presente en los fluidos reproductivos tanto femeninos como masculinos, actuaría a diferentes niveles para llevar adelante la fecundación.

Con respecto al mecanismo molecular por el cual el GABA produce el efecto descrito, nuestros resultados apoyan resultados previos descritos por Zeng y col. (1995) para espermatozoides de toro y ratón y por Garcia y Meizel (1999b) para espermatozoides humanos, quienes demostraron que durante la capacitación ocurre una hiperpolarización de la membrana plasmática de los espermatozoides y salida de iones Cl<sup>-</sup>. De esta manera, el efecto del GABA sobre la capacitación podría estar mediado por la hiperpolarización de la membrana plasmática, resultante de la apertura de canales de Cl<sup>-</sup> asociados al receptor GABA<sub>A</sub>. En su momento, la hiperpolarización de la membrana plasmática podría ser responsable de la transición de canales T de Ca<sup>2+</sup> de un estado inactivo a un estado activo (Florman y col., 1998). En este sentido, Ritta y colaboradores (2004) demostraron que el GABA produce un aumento del [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> y de la producción de AMPc en espermatozoides capacitados de bovinos y que el incremento del [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> fue bloqueado por el uso de picrotoxina mientras que el de AMPc lo fue por el uso de bicuculina.

Como conclusión, estos resultados indican la presencia de GABA en el fluido oviductal de la oveja en concentraciones compatibles con las requeridas para capacitar espermatozoides *in vitro*. Adicionalmente, el fluido oviductal filtrado (fracción de bajo peso molecular) indujo capacitación en los espermatozoides de manera semejante a la producida por el GABA *in vitro*. El uso de antagonistas del receptor GABA<sub>A</sub> (picrotoxina y bicuculina) produjo la desaparición del efecto capacitante del fluido oviductal filtrado.

Por otra parte, se demostró por electroforesis la presencia del receptor GABA<sub>A</sub> en el espermatozoide de carnero.

Estos resultados apoyan un papel fisiológico para el GABA en la función del espermatozoide durante la fecundación.

## 10. CONCLUSION

Los resultados presentados en esta tesis indican que el GABA presente en condiciones fisiológicas en el oviducto de oveja posee una acción sobre la capacitación de los espermatozoides, en un mecanismo mediado por un receptor de GABA tipo A, y que la fosforilación en residuos tirosina podría mediar este mecanismo. Estos resultados pueden contribuir al desarrollo de medios de capacitación y fecundación químicamente definidos, evitando la incertidumbre que resulta del uso de componentes de origen biológico.

La evaluación del efecto del GABA en pruebas *in vivo* ofrece una interesante perspectiva de estudios que posibiliten su implementación en condiciones de producción.

## 11. PUBLICACIONES

Los resultados de la presente Tesis dieron origen a las siguientes publicaciones:

### 11.1. Revistas :

-Valcarcel A, de las Heras MA, Perez L, Moses DF, Baldassarre H, 1994. Fluorescent staining as a method of assessing membrane damage and post-thaw survival of ram spermatozoa. *Theriogenology* 41:483-489.

-Moses D, de las Heras M, Valcarcel A, Perez L, Baldassarre H, 1995. Use of computerized motility analyzer for the evaluation of frozen-thawed ram spermatozoa. *Andrologia* 27:25-29.

-Perez LJ, Valcarcel A, de las Heras MA, Moses DF, Baldassarre H, 1996. In vitro capacitation and induction of acrosomal exocytosis in ram spermatozoa as assessed by the chlortetracycline assay. *Theriogenology* 45:1037-1046.

-Valcarcel A, de las Heras MA, Perez L, Moses DF, Baldassarre H, 1997. Assessment of the acrosomal status of membrane-intact ram spermatozoa after freezing and thawing, by simultaneous lectin/Hoechst 33258 staining. *Anim Reprod Sci* 45:299-309.

-Perez LJ, Valcarcel A, de las Heras MA, Baldassarre H, 1997. Comparative study of four techniques for evaluation of sperm quality in ovine and bovine frozen-thawed samples. *Reprod. Domest. Anim.* 32/3 : 155-158

-de las Heras MA, Valcarcel A, Perez L, 1997. In vitro capacitating effect of gamma-aminobutyric acid (GABA) in ram spermatozoa. *Biol Reprod* 56:964-968.

-Valcarcel A; 1999. Eventos asociados a la capacitación de espermatozoides de mamíferos. *Rev. Med. Reprod.* 2:18-30.

-Valcarcel A, Martinez AG, 2001. Capacitación y fosforilación de proteínas en espermatozoides de Mamíferos. *Rev Med Reprod* 4:145-158.

## **11.2. Comunicaciones a congresos:**

-Moses DF, de las Heras MA, Valcarcel A, de Matos DG, Perez L, Baldassarre H, 1993. Aplicación del analizador computarizado de movimiento CellTrakR al estudio de los parámetros cinéticos del espermatozoide de carnero. Resúmenes. Cuarto Encuentro Académico Tecnológico. Universidad Nacional del Nordeste, Resistencia (Chaco), del 22 al 24 de septiembre de 1993 : 175

-Moses DF., de las Heras MA, Valcarcel A, Perez L, Baldassarre H, 1993. Aplicación del análisis computarizado para la evaluación de parámetros cinéticos de espermatozoides de carnero frescos y descongelados. Resúmenes. Cuarto Encuentro Académico Tecnológico. Universidad Nacional del Nordeste, Resistencia (Chaco), del 22 al 24 de septiembre de 1993: 175

-Valcarcel A, de las Heras MA, Perez L, Moses DF, Baldassarre H, 1993. Evaluación del daño de membrana y sobrevida post-descongelado de espermatozoides de carnero mediante el uso de marcadores fluorescentes. Resúmenes. Simposio Internacional de Reproducción Animal. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, del 22 al 24 de octubre de 1993 : 152

-Perez LJ, Valcarcel A, de las Heras MA, 1996. Estudio comparativo de cuatro técnicas para la evaluación de la calidad espermática en muestras de semen congeladas/descongeladas de ovinos y bovinos. Resúmenes. 20<sup>o</sup> Congreso Argentino de Producción Animal. Río Hondo (Santiago del Estero), del 19 al 21 de junio de 1996. Rev. Arg. Prod. Anim. 16 Supl. 1 : 57-58.

-de las Heras MA, Valcarcel A, Perez L, Moses DF, 1996. In vitro capacitating effect of gamma-aminobutyric acid (GABA) in ram spermatozoa. Proceedings. 13th International Congress on Animal Reproduction, Volume 2. Sydney (Australia), del 30 de junio al 4 de julio de 1996 : P12-20.

-Valcarcel A, de las Heras MA, Perez L, Moses DF, 1996. Simultaneous lectin/Hoechst 33258 staining for the assessment of acrosomal status in membrane-intact fresh and frozen/thawed ram spermatozoa. Proceedings. Techniques for Gamete Manipulation and

Storage. Ruakura Research Centre, Hamilton (Nueva Zelanda), del 22 al 26 de junio de 1996 : 53.

-Vulcano GJ, Moses DF, de las Heras MA, Valcarcel A, 1997. Dedución de una ecuación lineal para la clasificación de espermatozoides según su motilidad. Trabajos seleccionados. Simposio de Investigación Operativa. Resúmenes Vigésimosexta Jornadas Argentinas de Informática e Investigación Operativa. Facultad de Ingeniería. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, del 11 al 15 de agosto de 1997 : 75-83.

-Valcarcel A, 1998. Capacitación y reacción acrosómica en espermatozoides de Mamíferos. Eventos asociados". Memorias del 1er Simposio Internacional de Biotecnologías Aplicadas en Reproducción Animal. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Lomas de Zamora, del 12 al 14 de agosto de 1998 : 70-82.

## 12. BIBLIOGRAFIA

- Aanesen A, Bendvold E, 1989. The Cellsoft computerized semen analysis system. I: Consistency of measurements and stability of results in relation to sample size analyzed. *Andrologia* 21:559-567.
- Aanesen A, Fried G, Andersson E, Gottlieb C, 1995. Evidence for  $\gamma$ -aminobutyric acid specific binding sites on human spermatozoa. *Hum Reprod* 10:1885-1890.
- Aanesen A, Fried G, Andersson E, Gottlieb C, 1996. Carrier-mediated gamma-aminobutyric acid uptake in human spermatozoa indicating the presence of a high-affinity gamma-aminobutyric acid transport protein. *Biol Reprod* 54:841-846.
- Abeydeera LR, Funahashi H, Kim N-H, Day BN, 1997. Chlortetracycline fluorescence patterns and *in vitro* fertilization of frozen-thawed boar spermatozoa incubated under various bicarbonate concentrations. *Zygote* 5:117-125.
- Abou-Haila A, Tulsiani DR, 2000. Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. *Arch Biochem Biophys* 379:173-182.
- Adeoya-Osiguwa SA, Fraser LR, 1993. A biphasic pattern of uptake by mouse spermatozoa *in vitro* correlates with changing functional potential. *J Reprod Fert* 99:187-194.
- Adeoya-Osiguwa S, Fraser LR, 1994. Evidence for  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent ATPase activity, modulated by decapacitating factors and calmodulin, in mouse spermatozoa. *J Reprod Fertil (Abstr Ser)* 14:9-10.
- Adeoya-Osiguwa S, Fraser LR, 1996. Evidence for  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent ATPase activity, stimulated by decapacitating factors and calmodulin, in mouse spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 44:111-120.
- Adeoya-Osiguwa SA, Fraser L, 2000. Fertilization promoting peptide and adenosine, acting as first messengers, regulate cAMP production and consequent protein tyrosine phosphorylation in a capacitation-dependent manner. *Mol Reprod Dev* 57:384-392.
- Adeoya-Osiguwa SA, Fraser LR, 2003. Calcitonin acts as a first messenger to regulate adenylyl cyclase/cAMP and mammalian sperm function. *Mol Reprod Dev* 65:228-236.
- Adeoya-Osiguwa S, Dudley RK, Hosseini R, Fraser L, 1998. FPP modulates mammalian sperm function via TCP-11 and the adenylyl cyclase/cAMP pathway. *Mol Reprod Dev* 51:468-476.

- Aguas AP, Pinto da Silva P, 1983. Regionalization of transmembrane glycoproteins in the plasma membrane of boar sperm heads in revealed by fracture-label. *J Cell Biol* 97:1356-1364.
- Ahmad K; Bracho GE, Wolf DP, Tash JS, 1995. Regulation of human sperm motility and hyperactivation components by calcium, calmodulin and protein phosphatases. *Arch Androl* 35:187-209.
- Ain R, Devi KU, Shivaji S, Seshagiri PB, 1999. Pentoxifylline-stimulated capacitation and acrosome reaction in hamster spermatozoa: involvement of intracellular signalling molecules. *Mol Hum Reprod* 5:618-626.
- Aitken RJ, 1997a. Molecular mechanisms regulating human sperm function. *Mol Hum Reprod* 3:169-173.
- Aitken RJ, 1997b. The extragenomic action of progesterone on human spermatozoa. *Human Reprod* 12 Natl Suppl:38-42.
- Aitken RJ, Brindle JP, 1993. Analysis of the ability of three probes targeting the outer acrosomal membrane or acrosomal contents to detect the acrosome reaction in human spermatozoa. *Human Reprod* 8:1663-1669.
- Aitken RJ, Buckingham DW, Fang HG, 1993. Analysis of the responses of human spermatozoa to A23187 employing a novel technique for assessing the acrosome reaction. *J Androl* 14:132-141.
- Aitken RJ, Paterson M, Fisher H, Buckingham DW, van Duin M, 1995. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *J Cell Sci* 108:2017-2025.
- Aitken RJ, Buckingham DW, Harkiss D, Paterson M, Fisher H, Irvine S, 1996. The extragenomic action of progesterone on human spermatozoa is influenced by redox regulated changes in tyrosine phosphorylation during capacitation. *Mol Cell Endocrin* 117:83-93.
- Aitken RJ, Harkiss D, Knox W, Paterson M, Irvine DS, 1998. On the cellular mechanisms by which the bicarbonate ion mediates the extragenomic action of progesterone on human spermatozoa. *Biol Reprod* 58:186-196.
- Aitken RJ, Ryan AL, Baker MA, McLaughlin EA, 2004. Redox activity associated with the maturation and capacitation of mammalian spermatozoa. *Free Radic Biol Med* 36:994-1010.



- Akinci MK, Schofield PR, 1999. Widespread expression of GABA(A) receptor subunits in peripheral tissues. *Neurosci Res* 35:145-153.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts Kenny, Watson JD, 1992. *Biología Molecular de la Célula*. 2da edición. Ediciones Omega, Barcelona, España :1300.
- Allison AC, Hartree EF, 1970. Lysosomal enzymes in the acrosome and their possible role in fertilization. *J Reprod Fertil* 21:501-515.
- Althouse GC, Hopkins SM, 1995. Assessment of boar sperm viability using a combination of two fluorophores. *Theriogenology* 43:595-603.
- Alvarez JG, Touchtone JC, Blasco L, Storey BT, 1987. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa: superoxide dismutase as a major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J Androl* 8:338-348.
- Amenta F, Cavallotti C, Mione MC, Erdo SL, 1986. Segmental distribution and gestational changes of GABA-transaminase activity in the rat oviduct. *J Reprod Fertil* 78:593-599.
- Amenta F, Cavallotti C, Ferrante F, Erdo SL, 1988. Autorradiographic visualization of the GABA-A receptor agonist, 3H-muscimol in the rat uterus. *Pharmacol Res Commun* 20:863-868.
- Amin AH, Bauçiley JL, Storey BT, Blasco L, Heyner S, 1996. A comparison of three methods for detecting the acrosome reaction in human spermatozoa. *Hum Reprod* 11:741-745.
- Anakwe OO, Gerton GL, 1990. Acrosome biogenesis during meiosis: Evidence from the synthesis and distribution of an acrosomal glycoprotein, acrogranin, during guinea pig spermatogenesis. *Biol Reprod* 42:317-328.
- Anbazhagan V, Swamy MJ, 2005. Thermodynamics of phosphorylcholine and lysophosphatidylcholine binding to the major protein of bovine seminal plasma, PDC-109. *FEBS Lett* 579:2933-2938.
- Andersson AC, Henningsson S, Von Schéele C, 1980. Formation of GABA via oxidative deamination of putrescine of immature rats after gonadotrophin stimulation. *Agents Actions* 10:106-107.
- Andrews JC, Nolan JP, Hammerstedt RH, Bavister B.D, 1994. Role of zinc during hamster sperm capacitation. *Biol Reprod* 51:1238-1247.
- Anwar N, Mason DFJ, 1982. Two actions of  $\gamma$ -aminobutyric acid on the responses of the isolated basilar artery from the rabbit. *Br J Pharmacol* 75:177-181.

- Aounuma S, Okabe M, Kawaguchi M, Kishi Y, 1981. Zinc effects on mouse spermatozoa and *in vitro* fertilization. *J Reprod Fertil* 63:463-466.
- Apud JA, Tappaz ML, Celotti F, Negri-Cesi P, Masotto C, Racagni G, 1984. Biochemical and immunochemical studies on the GABAergic system in the rat fallopian tube and ovary. *J Neurochem* 43:120-125.
- Aravindakshan TV, Sharma A, 1996. Effect of platelet activating factor on the motility and acrosome reaction of buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. *Theriogenology* 45:991-999.
- Arnoult C, Zeng Y, Florman HM, 1996. ZP3-dependent activation of sperm cation channels regulates acrosomal secretion during mammalian fertilization. *J Cell Biol* 134:637-645.
- Arnoult C, Kazam IG, Visconti PE, Kopf GS, Villaz M, Florman HM, 1999. Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:6757-6762.
- Arns MJ, Webb W, Johnson L, Martin J, Welsh T, Evans JW, 1991. Zona pellucida-induced acrosome reactions in equine spermatozoa. *J Reprod Fertil (Suppl)* 44:738-739.
- Asquith KL, Baleato RM, McLaughlin EA, Nixon B, Aitken RJ, 2004. Tyrosine phosphorylation activates surface chaperones facilitating sperm-zona recognition. *J Cell Sci* 117(Pt 16):3645-3657.
- Atherton RW, Radany EW, Polakoski KL, 1978. Spectrophotometric quantitation of mammalian spermatozoon motility I. *Human Biol Reprod* 18:624-628.
- Austin CR, 1951. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust J Sci Res* 4:581-596.
- Awapara J, Landua AJ, Fuerst R, Seale B, 1950. Free  $\gamma$ -aminobutyric acid in brain. *J Biol Chem* 187:35-39.
- Bacetti B, Pallini V, Burrini AG, 1976. The accessory fibers of the sperm tail. III. High sulfur and low sulfur components in mammals and cephalopods. *J Ultrastruct Res* 57:289-308.
- Backus KH, Arigoni M, Drescher U, Scheurer L, Malherbe P, Mohler H, Benson JA, 1993. Stoichiometry of a recombinant GABAA-receptor deduced from mutation-induced rectification. *NeuroReport* 5:285-288.

- Bajpai M, Asin S, Doncel GF, 2003. Effect of tyrosine kinase inhibitors on tyrosine phosphorylation and motility parameters in human sperm. *Arch Androl* 49:229-246.
- Baker JL, Owen DG, 1986. Electrophysiological pharmacology of GABA and diazepam in cultured CNS neurons. En: *Benzodiazepine/GABA receptors and chloride channels: Structural and functional properties*. Olsen RW, Venter JC (Eds), Alain R Liss, New York :135-165.
- Baker MA, Hetherington L, Ecroyd H, Roman SD, Aitken RJ, 2004. Analysis of the mechanism by which calcium negatively regulates the tyrosine phosphorylation cascade associated with sperm capacitation. *J Cell Sci* 117(Pt 2):211-222.
- Baker SS, Cardullo RA, Thaler CD, 2002. Sonication of mouse sperm membranes reveals distinct protein domains. *Biol Reprod* 66:57-64.
- Baldassarre H, Castro TE, Furnus CC, de Matos DG, 1994. *In vitro* maturation of sheep oocytes collected by laparoscopic folliculocentesis. *Theriogenology* 41:Abstract 159.
- Baldi E, Casana R, Falsetti C, Krausz C, Maggi M, Forti G, 1991. Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa. *J Androl* 12:323-330.
- Baldi E, Krausz C, Forti G, 1995. Non genomic actions of progesterone on human spermatozoa. *Trends Endocrinol Metab* 6:198-205.
- Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Krausz C, Forti G, 1996. Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: role of calcium, protein phosphorylation and lipid remodelling pathways. *Front Biosci* 1:189-205.
- Ballard LL, Seya T, Tecman J, Lublin DM, Atkinson JP, 1987. A polymorphism of the complement regulatory protein MCP (membrane cofactor protein or gp45-70). *J Immunol* 138:3850.
- Ballard LL, Bora NS, Yu GH, Atkinson JP, 1988. Biochemical characterization of membrane cofactor protein of the complement system. *J Immunol* 141:3923-3929.
- Barrios B, Fernandez-Juan M, Muino-Blanco T, Cebrian-Perez JA, 2005. Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins that protect ram spermatozoa against cold shock. *J Androl* 26:539-549.
- Baumber J, Meyers SA, 2006. Changes in membrane lipid order with capacitation in rhesus nacaque (*Macaca mulatta*) spermatozoa. *J Androl* 27:578-587.

- Baumber J, Sabeur K, Vo A, Ball BA, 2003. Reactive oxygen species promote tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa. *Theriogenology* 60:1239-1247.
- Bawa SR, Pabst MA, Werner G, Bains HK, 1993. Capacitated and acrosome reacted spermatozoa of goat (*Capra indicus*): a fluorescence and electron microscopic study. *Andrologia* 25:123-135.
- Bearer EL, Friend DS, 1990. Morphology of mammalian sperm membranes during differentiation, maturation, and capacitation. *J Electron Microsc Technol* 16:281-297.
- Bedford JM, 1970. Sperm capacitation and fertilization in mammals. *Biol Reprod* 2 Suppl:128-158.
- Bedford JM, 1983. Significance for need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals. *Biol Reprod* 28:108-120.
- Bedford JM, Chang MC, 1962. Removal of decapacitation factor from seminal plasma by high speed centrifugation. *Am J Physiol* 202:179-181.
- Bedford JM, Hoskins DD, 1990. The mammalian spermatozoon: morphology, biochemistry and physiology. En: *Marshall's Physiology of Reproduction*. Lamming GE (ed), London, Churchill Livingstone, Vol 2 :456-473.
- Bellvé AR, O'Brien DA, 1983. The mammalian spermatozoon: Structure and temporal assembly. En: Hartmann HF ed. *Mechanisms and Control of Animal Fertilization*. Orlando: Academic Press :55-137.
- Bellvé AR, Chandrika R, Martinova YS, Barth AH, 1992. The perinuclear matrix as a structural element of the mouse sperm nucleus. *Biol Reprod* 47:451-465.
- Belmonte SA, Lopez CI, Roggero CM, De Blas GA, Tomes CN, Mayorga LS, 2005. Cholesterol content regulates acrosomal exocytosis by enhancing Rab3A plasma membrane association. *Dev Biol* 285:393-408.
- Ben-Ari Y, Cherubini E, Corradetti R, Gaiarsa JL, 1989. Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurons. *J Physiol* 416:303-325.
- Ben-Av, P, Rubinstein S, Breitbart H, 1988. Induction of acrosomal reaction and calcium uptake in ram spermatozoa by ionophores. *Biochim Biophys Acta* 939:214-222.
- Benoff S, 1993. Preliminaries to fertilization. The role of cholesterol during capacitation of human spermatozoa. *Hum Reprod* 8:2001-2008.

- Benoff S, Hurley I, Cooper GW, Mandel FS, Rosenfeld DL, Hershlag A, 1993a. Head-specific mannose-ligand receptor expression in human spermatozoa is dependent on capacitation-associated membrane cholesterol loss. *Hum Reprod* 8:2141-2154.
- Benoff S, Hurley I, Cooper GW, Mandel FS, Hershlag A, Scholl GM, Rosenfeld DL, 1993b. Fertilization potential *in vitro* is correlated with head-specific mannose-ligand receptor expression, acrosome status and membrane cholesterol content. *Hum Reprod* 8:2155-2166.
- Berger T, 1990. Changes in expressed membrane proteins during *in vitro* capacitation of boar sperm. *Mol Reprod Dev* 27:249-253.
- Bergeron A, Villemure M, Lazure C, Manjunath P, 2005. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. *Mol Reprod Dev* 71:461-470.
- Bernasconi R, Bittiger H, Heid J, Martin P, 1980. Determination of GABA levels by a (<sup>3</sup>H)-muscimol radioreceptor assay. *J Neurochem* 34:614-618.
- Berube B, Lefievre L, Coutu L, Sullivan R, 1996. Regulation of the epididymal synthesis of P26h, a hamster sperm protein. *J Androl* 17:104-110.
- Beyler SA, Zaneveld LJD, 1982. Inhibition of *in vitro* fertilization of mouse gametes by proteinase inhibitors. *J Reprod Fertil* 66:425-431.
- Bian SL, Zhang W, Zhu H, Ni J, Yao LC, Chen L, 2002. Effect of gamma-aminobutyric acid on the sperm acrosin activity. *Zhonghua Nan Ke Xue* 8:326-328.
- Biggers JD, Whitten WK, Whittingham DC, 1971. The culture of mouse embryos *in vitro*. En: Daniel JC (ed). *Methods in Mammalian Embryology*. San Francisco. WH Freeman & Co:86-116.
- Blackmore PF, Beebe SJ, Danforth DR, Alexander N, 1990. Progesterone and 17 alpha-hydroxyprogesterone. Novel stimulators of calcium influx in human sperm. *J Biol Chem* 265:1376-1380.
- Blackmore PF, Neulen J, Lattanzio F, Beebe SJ, 1991. Cell surface-binding sites for progesterone mediate calcium uptake in human sperm. *J Biol Chem* 266:18655-18659.
- Blackmore PF, Im WB, Bleasdale JE, 1994. The cell surface progesterone receptor which stimulates calcium influx in human sperm is unlike the A ring reduced steroid site on the GABA<sub>A</sub> receptor/chloride channel. *Mol Cell Endocrinol* 104:237-243.
- Blach EL, Amann RP, Bowen RA, Frantz D, 1989. Changes in quality of stallion spermatozoa during cryopreservation: Plasma membrane integrity and motion characteristics. *Theriogenology* 31:283-298.

- Blom E, 1968. A new sperm defect—"pseudodroplets"—in de middle piece of the bull sperm. *Nord Vet Med* 20:279-283.
- Boldizar L, Werkele E, Ven E, Sarlos P, Barna J, 1992. Neurotransmitter amino acids as modulators of biological processes of spermatozoa. En: *GABA Outside the CNS*. Erdo SL (Ed), Springer-Verlag, New York :199-211.
- Bonano G, Raiteri M, 1993. Multiple GABA<sub>B</sub> receptors. *TIPS* 14:259-261.
- Boquest AC, Smith JF, Briggs RM, Duganzich DM, Summers PM, 1999. Effects of bovine oviductal proteins on bull spermatozoal function. *Theriogenology* 51:583-595.
- Borboni P, Porzio O, Fusco A, Sesti G, Lauro R, Marlier LN, 1994. Molecular and cellular characterization of the GABA<sub>A</sub> receptor in the rat pancreas. *Mol Cell Endocrinol* 103:157-163.
- Bormann J, 1988. Electrophysiology of GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptor subtypes. *Trends Neurosci* 18:515-519.
- Bormann J, 2000. The "ABC" of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci* 21:16-19.
- Borman J, Feigenspan A, 1995. GABA<sub>C</sub> receptors. *Trends in Neurosciences* 18:515-519.
- Boué F, Brube B, de Lamirande E, Gagnon C, Sullivan R, 1994. Human sperm-zona pellucida interaction is inhibited by antiserum against a hamster sperm protein. *Biol Reprod* 51:577-587.
- Boué F, Blais J, Sullivan R, 1996. Surface localization of P34H and epididymal protein, during maturation, capacitation, and acrosome reaction of human spermatozoa. *Biol Reprod* 54: 1009-1017.
- Boue-Grabot E, Taupignon A, Tramu G, Garret M, 2000. Molecular and electrophysiological evidence for a GABA<sub>C</sub> receptor in thyrotropin-secreting cells. *Endocrinology* 141:1627-1632.
- Bowery N, 1989. GABA<sub>B</sub> receptors and their significance in mammalian pharmacology. *TIPS* 10:401-407.
- Bowery NG, Doble A, Hill DR, Hudson AL, 1981. Bicuculline-insensitive GABA receptors on peripheral autonomic nerve terminals. *Eur J Pharmacol* 71:53-70.
- Bowery NG, Hill DR, Hudson AL, 1983. Characteristics of GABA<sub>B</sub> receptor binding sites on rat whole brain synaptic membranes. *Br J Pharmacol* 78:191-206.
- Boyers SP, Davis RO, Katz DF, 1989. Automated semen analysis. *Curr Prob Obstet Gynecol Fertil* XII:167-200.

- Brandelli A, 1997. Modulation of sperm acrosomal exocytosis by guanyl nucleotides and G-protein-modifier agents. *Biochem Mol Biol Int* 41:1217-1225.
- Brandelli A, Miranda PV, Tezon JG, 1994. Participation of glycosylated residues in the human sperm acrosome reaction: possible role of N-acetylglucosaminidase. *Biochim Biophys Acta* 1220:299-304.
- Brandelli A, Miranda PV, Añon-Vazquez MG, Marin-Briggiler CI, Sanjurjo C, Gonzalez-Echeverria F, Blaquier JA, Tezon JG, 1995. A new predictive test for *in-vitro* fertilization based on the induction of sperm acrosome reaction by N-acetylglucosamine-neoglycoprotein. *Hum Reprod* 10:1751-1756.
- Bray C, Son JH, Kumar P, Harris JD, Meizel S, 2002. A role for the human sperm glycine receptor/Cl<sup>-</sup> channel in the acrosome reaction initiated by recombinant ZP3. *Biol Reprod* 66:91-97.
- Breitbart H, 2002. Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. *Mol Cell Endocrinol* 187:139-144.
- Breitbart H, 2003. Signaling pathways in sperm capacitation and acrosome reaction. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 49:321-327.
- Breitbart H, Spungin B, 1997. The biochemistry of the acrosome reaction. *Mol Hum Reprod* 3:195-202.
- Breitbart H, Lax J, Rotem R, Naor Z, 1992. Role of protein kinase C in the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Biochem J* 281:473-476.
- Breitbart H, Cohen G, Rubinstein S, 2005. Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Reproduction* 129:263-268.
- Breitbart H, Rubinstein S, Etkovitz N, 2006. Sperm capacitation is regulated by the crosstalk between protein kinase A and C. *Mol Cell Endocrinol* 252: 247-249.
- Brenner E, Rubinstein S, Cohen G, Shternall K, Rivlin J, Breitbart H, 2003. Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol Reprod* 68:837-845.
- Brewis IA, Clayton R, Browes CE, Martin M, Barrat CLR, Hornby DP, Moore HDM, 1998. Tyrosine phosphorylation of a 95 kDa protein and induction of the acrosome reaction in human spermatozoa by recombinant human zona pellucida glycoprotein 3. *Mol Hum Rep* 4:1136-1144.
- Brown CR, 1981. Distribution of hyaluronidase in the ram spermatozoon. *J Reprod Fertil* 45:537-539.

- Brown CR, Harrison RAP, 1978. The activation of proacrosin in spermatozoa from ram, bull and boar. *Biochim Biophys Acta* 526:202-217.
- Brown DA, Higgins AJ, 1979. Presynaptic effects of gamma-aminobutyric acid in isolated rat superior cervical ganglia. *British J Pharmacol* 66:108P-109P.
- Brucker C, Lipford GB, 1995. The human sperm acrosome reaction: physiology and regulatory mechanisms. An update. *Hum Reprod Update* 1:51-62.
- Brucker C, Kaßner G, Löser C, Hinrichsen M, Lipford GB, 1994. Progesterone-induced acrosome reaction: potential role for sperm acrosome antigen-1 in fertilization. *Hum Reprod* 9:1897-1902.
- Bryan JHD, Akruk SR, 1977. A naphthol yellow S and erythrosin B staining procedure for use in studies of acrosome reaction of rabbit spermatozoa. *Stain Tech* 52:47-51.
- Burrello N, Vicari E, D'Amico L, Satta A, D'Agata R, Calogero AE, 2004. Human follicular fluid stimulates the sperm acrosome reaction by interacting with the gamma-aminobutyric acid receptors. *Fertil Steril* 82 Suppl 3:1086-1090.
- Burkman LJ, 1990. Hyperactivated motility on human spermatozoa during in vitro capacitation and implications for fertility. En: Gagnon C (ed). *Controls of Sperm Motility: Biological and Clinical Aspects*. Boca Raton, FL, USA, CRC Press : 303-329.
- Burks DJ, Carballada R, Moore HDM, Saling PM, 1995. Interaction of a tyrosine kinase from human sperm with the zona pellucida at fertilization. *Science* 269:83-86.
- Burrello N, Vicari E, D'Amico L, Satta A, D'Agata R, Calogero AE, 2004. Human follicular fluid stimulates the sperm acrosome reaction by interacting with the gamma-aminobutyric acid receptors. *Fertil Steril* 82 Suppl 3:1086-1090.
- Burrige K, Feramisco JR, 1982.  $\alpha$ -Actinin and vinculin from non-muscle cells: Calcium-sensitive interactions with actin. En: *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Vol XLVI, Part 2*. New York: Cold Spring Harbor Laboratories:587-597.
- Byrd W, Wolf DP, 1986. Acrosomal status in fresh and capacitated human ejaculated sperm. *Biol Reprod* 34:859-869.
- Calabresi P, Mercuri NB, De Murtas M, Bernardi C, 1991. Involvement of GABA systems in feedback regulation of glutamate- and GABA-mediated synaptic potentials in rat neostriatum. *J Physiol* 440:581-599.



- Callachan H, Cotrell GA, Hather NY, Lambert JJ, Nooney JM, Peters JA, 1987a. Modulation of the GABAA receptor by progesterone metabolites. *Proc R Soc London B* 231:359-389.
- Callachan H, Lambert JJ, Peters JA, 1987b. Modulation of the GABAA receptor by barbiturates and steroids. *Neurosci Lett Suppl* 29:S21.
- Calogero AE, Hall J, Fishel S, Green S, Hunter A, D'Agata R, 1996. Effects of gamma-aminobutyric acid on human sperm motility and hyperactivation. *Mol Hum Reprod* 2:733-738.
- Calogero AE, Burrello N, Ferrara E, Hall J, Fishel S, D'Agata R; 1999.  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) A and B receptors mediate the stimulatory effects of GABA on the human sperm acrosome reaction: interaction with progesterone. *Fertil Steril* 71:930-936.
- Calogero AE, Burrello N, Barone N, Palermo I, Grasso U, D'Agata R, 2000. Effects of progesterone on sperm function: mechanisms of action. *Hum Reprod* 15 Suppl 1:28-45.
- Calvo L, Dennison-Lagos L, Banks SM, Fugger EF, 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.
- Calzada L, Tellez J, 1997. Defective function of membrane potential ( $\psi$ ) on sperm of infertile men. *Arch Androl* 38:151-155.
- Calzada L, Bernal A, Loustaunau E, 1988. Effect of steroids hormones and capacitation on membrane potential of human spermatozoa. *Arch Androl* 21:121-128.
- Calzada L, Salazar EL, Macias H, 1991. Hyperpolarization/depolarization on human sperm. *Arch Androl* 26:71-78.
- Camatini M, Colombo A, Bonfanti P, 1991. Identification of spectrin and calmodulin in rabbit spermiogenesis and spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 28:62-69.
- Campanella C, Gabbiani G, Baccetti B, Burrini AG, Pallini V, 1979. Actin and myosin in the vertebrate acrosomal region. *J Submicrosc Cytol* 11:53-71.
- Cao X, Ben K, Wang Y, Wang Y, 1997. Effects of  $\gamma$ -aminobutyric acid, progesterone and ionophore A23187 on acrosome reaction of tree shrew sperm in vitro: examination of acrosome reaction with an improved fluorescence microscopy. *Anim Reprod Sci* 49:225-234.
- Cardinali DP, Golombek DA, 1998. The rhythmic GABAergic system. *Neurochem Res* 23:607-614.

- Caron PC, Cote LJ, Kremzner LT, 1988. Putrescine, a source of  $\gamma$ -aminobutyric acid in the adrenal gland of the rat. *Biochem J* 251:559-562.
- Carrera A, Moss J, Ning XP, Gerton GL, Tesarik J, Kopf GS, Moss SB, 1996. Regulation of protein tyrosine phosphorylation in human sperm by a calcium/calmodulin-dependent mechanism: identification of A kinase anchor protein as major substrates for tyrosine phosphorylation. *Dev Biol* 180:284-296.
- Carver-Ward JA, Jaroudi KA, Einspinner M, Parhar RS, Al-Sedairy ST, Sheth KV, 1994. Pentoxifylline potentiates ionophore (A23187) mediated acrosome reaction in human sperm: flow cytometric analysis using CD46 antibody. *Hum Reprod* 9:71-76.
- Casey PJ, Hillman RB, Robertson KR, Yudin AI, Drobnis EZ, 1993. Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. *J Androl* 14:289-297.
- Catalano PN, Bonaventura MM, Silveyra P, Bettler B, Libertun C, Lux-Lantos VA, 2005. GABA(B1) knockout mice reveal alterations in prolactin levels, gonadotropic axis, and reproductive function. *Neuroendocrinology* 82:294-305.
- Celotti F, Apud JA, Rovescalli AC, Melcangi RC, Negri-Celsi P, Racagni G, 1986. The GABAergic extrinsic innervation of the rat fallopian tubes: biochemical evidence and endocrine modulation. En: *GABA and Endocrine function*. Racagni G, Donoso A (Eds). Raven Press, New York :251-264.
- Celotti F, Apud JA, Rovescalli AC, Negri-Cesi P, Racagni G, 1987. Possible involvement of ovarian mechanisms other than estrogen-progesterone secretion in the regulation of glutamic acid decarboxylase activity of the rat fallopian tubes. *Endocrinology* 120:700-706.
- Centola GM, Mattox JH, Burde S, Leary JF, 1990. Assessment of the viability and acrosome status of fresh and frozen-thawed human spermatozoa using single-wavelength fluorescence microscopy. *Mol Reprod Dev* 27:130-135.
- Centola GM, Raubertas RF, Mattox JH, 1992. Cryopreservation of human semen. Comparison of cryopreservatives, sources of variability, and prediction of post-thaw survival. *J Androl* 13:283-288.
- Centola GM, Weisensel SP, Lewis B, Andolina EG, Herko RC, 1997. Time course of spontaneous in vitro sperm acrosome reaction. *J Androl* 18:556-562.
- Chang MC, 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited in the fallopian tubes. *Nature* 168:697-698.

- Chang Y, Wang R, Barot S, Weiss DS, 1996. Stoichiometry of a recombinant GABAA receptor. *J Neurosci* 16:5415-5424.
- Chavarria ME, Reyes A, 1996. Secretions of ovine uterus and oviduct induce in vitro capaciation of ram spermatozoa. *Arch Androl* 36:17-23.
- Chebib M, Johnston GA, 1999. The “ABC” of GABA receptors: a brief review. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26:937-940.
- Check ML, Check JH, Long R, 1991. Detrimental effects of cryopreservation on the structural and functional integrity of the sperm membrane. *Arch Androl* 27:155-160.
- Chen JS, Doncel GF, Alvarez C, Acosta AA, 1995. Expression of mannose-binding sites on human spermatozoa and their role in sperm-zona pellucida binding. *J Androl* 16:55-63.
- Chen WY, Yuan YY, Shi QX, Zhang XY, 2000. Effect of protein C on guinea pig sperm acrosome reaction induced by progesterone. *Acta Pharmacol Sin* 21:787-791.
- Chen WY, Ni Y, Pan YM, Shi QX, Yuan YY, Chen AJ, Mao LZ, Yu SQ, Roldan ER, 2005. GABA, progesterone and zona pellucida activation of PLA2 and regulation by MEK-ERK1/2 during acrosomal exocytosis in guinea pig spermatozoa. *FEBS Lett* 579:4692-4700.
- Cheng FP, Fazeli A, Voorhout WF, Marks A, Bevers MM, Colenbrander B, 1996. Use of peanut agglutinin to assess the acrosomal status and the zona pellucida-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa. *J Androl* 17:674-682.
- Cheng FP, Fazeli AR, Voorhout WF, Tremoleda JL, Bevers MM, Colenbrander B, 1998. Progesterone in mare follicular fluid induces the acrosome reaction in stallion spermatozoa and enhances in vitro binding to the zona pellucida. *Int J Androl* 21:57-66.
- Cheng WTK, Moor RM, Polge C, 1986. In vitro fertilization of pig and sheep oocytes matured in vivo and in vitro. *Theriogenology* 25:146-149.
- Chian RI-C, LaPointe S, Sirard MA, 1995. Capacitation in vitro of bovine spermatozoa by oviduct cell monolayer conditioned medium. *Mol Reprod Dev* 42:318-324.
- Choi DW, Farb DH, Fischbach GD, 1977. Chlordiazepoxide selectively augments GABA action in spinal cord cell cultures. *Nature* 269:342-344.
- Christensen P, Whitfield CH, Parkinson TJ, 1994. The use of bright-field microscopy in evaluating bovine acrosome reaction. *Theriogenology* 42:655-662.

- Christensen P, Whitfield CH, Parkinson TJ, 1996. In vitro induction of acrosome reactions in stallion spermatozoa by heparin and A23187. *Theriogenology* 45:1201-1210.
- Clarke GN, Yanagimachi R, 1978. Actin in mammalian sperm heads. *J Exp Zool* 205:125-132.
- Clarke GN, Clarke FM, Wilson S, 1982. Actin in human spermatozoa. *Biol Reprod* 26:319-327.
- Clermont Y, Einberg E, Leblond CP, Wagner S, 1955. The perforatorium-an extension of the nuclear membrane of the rat spermatozoon. *Anat Rec* 121:1-12.
- Cognie Y, Guerin Y, Gyader C, Poulin N, Crozet N, 1991. In vitro fertilization of sheep oocytes matured in vivo. *Theriogenology* 35:393-400.
- Cohen G, Rubinstein S, Gur Y, Breitbart H, 2004. Crosstalk between protein kinase A and C regulates phospholipase D and F-actin formation during sperm capacitation. *Dev Biol* 267:230-241.
- Cohen-Dayag A, Eisenbach M, 1994. Potential assays for sperm capacitation in mammals. *Am J Physiol* 267:C1167-1176.
- Colas G, 1984. Semen technology in the ram. En: *The male in farm animal reproduction*. Courot M (ed) Martinus Nijhoff, New York :219-234.
- Collin S, Sirard MA, Dufour M, Bailey JL, 2000. Sperm calcium levels and chlortetracycline fluorescence patterns are related to the in vivo fertility of cryopreserved bovine semen. *J Androl* 21:938-943.
- Cooper GW, Overstreet JW, Katz DF, 1979. The motility of rabbit spermatozoa recovered from the female reproductive tract. *Gamete Res* 2:35-42.
- Cormier N, Sirard MA, Bailey JL, 1997. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *J Androl* 18 : 461-468.
- Cowan AE, Koppel DE, Vargas LA, Hunnicutt GR, 2001. Guinea pig fertilin exhibits restricted lateral mobility in epididymal sperm and becomes freely diffusing during capacitation. *Dev Biol* 236:502-509.
- Cross NL, 1996. Human seminal plasma prevents sperm from becoming acrosomally responsive to the agonist, progesterone: cholesterol is the major inhibitor. *Biol Reprod* 54:138-145.
- Cross NL, 1998. Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol Reprod* 59:7-11.

- Cross NL, Hanks SE, 1991. Effects of cryopreservation on human sperm acrosomes. *Human Reprod* 6:1279-1283.
- Cross NL, Overstreet JW, 1987. Glycoconjugates of the human sperm surface: distribution and alterations that accompany capacitation in vitro. *Gamete Res* 16:23-35.
- Cross NL, Watson SK, 1994. Assessing acrosomal status of bovine sperm using fluoresceinated lectins. *Theriogenology* 42:89-98.
- Cross NL, Razy-Faulkner P, 1997. Control of human sperm intracellular pH by cholesterol and its relationship to the response of the acrosome to progesterone. *Biol Reprod* 56:1169-1174.
- Cross NL, Morales P, Overstreet JW, Hanson FW, 1986. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Gamete Res* 15:213-226.
- Crozet N, Huneau D, De Smedt V, Théron MC, Szöllösi D, Torres S, Sévellec C, 1987. In vitro fertilization with normal development in the sheep. *Gamete Res* 16:159-170.
- Cuasnicu PS, Ellerman DA, Cohen DJ, Busso D, Morgenfeld MM, Da Ros VG, 2001. Molecular mechanisms involved in mammalian gamete fusion. *Arch Med Res* 32:614-618.
- Curry MR, Watson PF, 1995. Sperm structure and function. En: Grudzinkas JG and Yovich JL (eds). *Gametes. The Spermatozoon*. Cambridge University Press, Cambridge, UK : 45-69.
- Czaker R, 1985. Morphogenesis and cytochemistry of the postacrosomal dense lamina during mouse spermatogenesis. *J Ultrastruct Res* 90:26-39.
- Dalvit GC, Miragaya MH, Chaves MG, Beconi MT, 1995. Energy requirement of bovine spermatozoa for in vitro capacitation. *Theriogenology* 44:1051-1058.
- DasGupta S, Mills CL, Fraser LR, 1993. Ca<sup>2+</sup>-related changes in the capacitation state of human spermatozoa assessed by chlortetracycline fluorescence assay. *J Reprod Fertil* 99:135-143.
- DasGupta S, Mills CL, Fraser LR, 1994. A possible role for Ca<sup>2+</sup> ATPase in human sperm capacitation. *J Reprod Fertil* 102:107-116.
- David G, Serres C, Jouamnet P, 1981. Kinematics of human spermatozoa. *Gamete Res* 4:83-95.
- Davis BK, 1978. Inhibition of fertilizing capacity in mammalian spermatozoa by natural and synthetic vesicles. En: Kabara JJ (ed). *Symposium on the Pharmacological Effect of Lipids*. Champaign, IL : The American Oil Chemists Society : 145-157.

- Davis BK, Byrne R, Hungund B, 1979. Studies on the mechanism of capacitation. II. Evidence for lipid transfer between plasma membrane of rat sperm and serum albumin during capacitation in vitro. *Biochim Biophys Acta* 558:257-266.
- Davis RO, Boyers SP, 1992. The role of digital image analysis in reproductive biology and medicine. *Arch Pathol Lab Med* 116:351-363.
- D`Cruz OJ, Hass GGJr, 1996. Fluorescence-labeled fucoselectins are superior markers for flow cytometric quantification of the human sperm acrosome reaction. *Fertil Steril* 65:843-851.
- De Cesaris P, Fillippini A, Ziparo E, Russo MA, Stefanini M, 1989. Distribution of analogues of spectrin, fodrin and protein 4.1 in rat spermatogenic cells. *Prog Clin Biol Res* 296:149-152.
- De Jonge C, 2005. Biological basis for human capacitation *Hum Reprod Update* 11:205-214.
- De Jonge CJ, Han HL, Lawrie H, Mack SR, Zaneveld LJ, 1991. Modulation of the human sperm acrosome reaction by effectors of the adenylate cyclase/cyclic AMP second-messenger pathway. *J Exp Zool* 258:113-125.
- De Jonge CJ, Barrat CLR, Radwanska E, Cook ID, 1993. The acrosome reaction-inducing effect of human follicular and oviductal fluid. *J Androl* 14:359-365.
- de Kretser DM, Kerr JB, 1994. The cytology of the testis. En: *Physiology of Reproduction*. Vol 1, Eds: Knobil E, Neill J, Raven Press, New York:1177-1290.
- de Lamirande E, Gagnon C, 1995a. Capacitation-associated production of superoxide anion by human spermatozoa. *Free Rad Biol Med* 18:487-495.
- de Lamirande E, Gagnon C, 1995b. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Human Reprod* 10 (Suppl 1):15-21.
- de Lamirande E, Leclerc P, Gagnon C, 1997. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Mol Hum Reprod* 3:175-194.
- de Lamirande E, Gagnon C, 2003. Redox control of changes in protein sulfhydryl levels during human sperm capacitation. *Free Radic Biol Med* 35:1271-1285.
- de Lamirande E, Harakat A, Gagnon C, 1998. Human sperm capacitation induced by biological fluids and progesterone, but not by NADH or NADPH, is associated with the production of superoxide anion. *J Androl* 19:215-225.

- Delgado-Buenrostro NL, Hernandez-Gonzalez EO, Segura-Nieto M, Mujica A, 2005. Actin polymerization in the equatorial and postacrosomal regions of guinea pig spermatozoa during the acrosome reaction is regulated by G proteins. *Mol Reprod Dev* 70:198-210.
- Demarco IA, Espinosa F, Edwards J, Sosnik J, De La Vega-Beltran JL, Hockensmith JW, Kopf GS, Darszon A, Visconti PE, 2003. Involvement of a Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter in mouse sperm capacitation. *J Biol Chem* 278:7001-7009.
- Demott RP, Suarez SS, 1992. Hyperactivated sperm progress in the mouse oviduct. *Biol Reprod* 46:779-785.
- De Robertis E, 1986. GABAergic neurotransmission. An overview. En: *GABA and Endocrine Function*. Racagni G, Donoso AO (Eds), Raven Press, New York :1-12.
- Dib K, Ong J, 1995. GABA(B) receptors. *Pharmacol Therapeut* 67:187-246.
- Didion BA, Dobrinsky JR, Giles JR, Graves CN, 1989. Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. *Gamete Res* 22:51-57.
- Ding BB, Jiang C, Jiang WJ, Wang J, Gao ES, Tso JK, Shen QX, 2001. Immunocytochemical localization of fertilin beta on human sperm. *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao* 34:283-289.
- Dinkis MB, Brackett BG, 2000. Chlortetracycline staining patterns of frozen-thawed bull spermatozoa treated with beta-cyclodextrins, dibutyryl cAMP and progesterone. *Zygote* 8:245-256.
- Dobo E, Parducz A, Wolff JR, Erdö SL, 1992. GABA-immunoreactive structures in rat kidney. En: *GABA outside the CNS*. Erdö SL (Ed), Springer-Verlag, New York :155-166.
- Doherty CM, Tarchala SM, Radwanska E, DeJonge CJ, 1995. Characterization of two second messenger pathways and their interaction in eliciting the human sperm acrosome reaction. *J Androl* 16:36-46.
- Dolci S, Eusebi F, Siracusa G, 1985.  $\gamma$ -amino butyric acid sensitivity of mouse and human oocytes. *Dev Biol* 109:242-246.
- Dominguez L, Yunes RMF, Fornés MW, Mayorga LS, 1996. Acrosome reaction stimulated by the GTP non-hydrolyzable analogue GTP gamma S is blocked by phospholipase A2 inhibitors in human spermatozoa. *Int J Androl* 19:248-252.

- Dominguez L, Yunes RMF, Fornés MW, Burgos M, Mayorga LS, 1999. Calcium and phospholipase A2 are both required for the acrosome reaction mediated by G-proteins stimulation in human spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 52:297-302.
- Dorval V, Dufour M, Leclerc P, 2002. Regulation of the phosphotyrosine content of human sperm proteins by intracellular Ca<sup>2+</sup>: role of Ca<sup>2+</sup>-adenosine triphosphatases *Biol Reprod* 67:1538-1545.
- Dragileva E, Rubinstein S, Breitbart H, 1999. Intracellular Ca(2+)-Mg(2+)-ATPase regulates calcium influx and acrosomal exocytosis in bull and ram spermatozoa. *Biol Reprod* 61:1226-1234.
- Drobnis EZ, Yusin AI, Cherr GN, Katz DF, 1988a. Kinematics of hamster sperm during penetration of the cumulus cell matrix. *Gamete Res* 21:367-383.
- Drobnis EZ, Yusin AI, Cherr GN, Katz DF, 1988b. Hamster sperm penetration of the zona pellucida: kinematics analysis and mechanical implications. *Dev Biol* 130:311-323.
- Drobnis EZ, Zhong CQ, Overstreet JW, 1991. Separation of cryopreserved human semen using Sephadex columns, washing or Percoll gradients. *J Androl* 12:201-208.
- Druker BJ, Mamon HJ, Riberts TM, 1989. Oncogenes, growth factors, and signal transduction. *N Engl J Med* 321:1383-1391.
- Dube C, Tardif S, LeClerc P, Bailey JL, 2003. The importance of calcium in the appearance of p32, a boar sperm tyrosine phosphoprotein, during in vitro capacitation. *J Androl* 24:727-733.
- Dube C, Leclerc P, Baba T, Reyes-Moreno C, Bailey JL, 2005. The proacrosin binding protein, sp32, is tyrosine phosphorylated during capacitation of pig sperm. *J Androl* 26:519-528
- Dunphy BC, Kay R, Barrat CL, Cooke ID, 1989. Quality control during the conventional analysis of semen, an essential exercise. *J Androl* 10:378-385.
- Duncan AE, Fraser LR, 1993. Cyclic AMP dependent phosphorylation of epididymal mouse sperm proteins during capacitation in vitro: identification of an Mr 95000 phosphotyrosine-containing protein. *J Reprod Fertil* 97:287-299.
- Dutar P, Nicoll RA, 1988. Pre- and postsynaptic GABAB receptors in the hippocampus have different pharmacological properties. *Neuron* 1:585-591.
- Duvilanski BH, Diza M, Lasaga M, Seilicovich A, 1985. L-Glutamate decarboxylase activity in the ovary and fallopian tube during estrus cycle. *IRCS Med Sci* 13:81.



- Dvorakova K, Palecek J, Peknicova J, 2001. Changes in immunocytochemical localization of cytoskeletal proteins in boar spermatozoa after acrosome reaction induced by specific cytoskeletal inhibitors. *Folia Biol (Praha)* 47:18-27.
- Eddy EM, Koehler JK, 1982. Restricted domains of the sperm surface. *Scan Electron Microsc (Pt 3)*:1313-1323.
- Eddy EM, O'Brien DA, 1994. The spermatozoon. En: *Physiology of Reproduction*. Vol 1, Knobil E, Neill J (Eds). Raven Press, New York :29-77.
- Edwards EA, Konnerth A, Sakmann B, 1990. Quantal analysis of inhibitory synaptic transmission in the dentate gyrus of rat hippocampal slices: a patch-clamp study. *J Physiol* 430:213-249.
- Emiliozzi C, Fenichel P, 1997. Protein phosphorylation is associated with capacitation of human sperm in vitro but is not sufficient for its completion. *Biol Reprod* 56:674-679.
- Enz R, Cutting GR 1998. Molecular composition of GABAC receptors. *Vision Res* 38:1431-1441.
- Erdö SL, 1983a. Characterization of GABA-ergic system in the fallopian tube. *Int J Fertil* 28:8-9.
- Erdö SL, 1983b. High affinity, sodium-dependent  $\gamma$ -aminobutyric acid uptake by slices of rat ovary. *J Neurochem* 40:582-584.
- Erdö SL, 1984a. Identification of GABA receptor binding sites in the rat and rabbit uterus. *Biochem Biophys Res Commun* 125:18-24.
- Erdö SL, 1984b. Alteration of GABA levels in ovary and fallopian tube of the pregnant rat. *Life Sci* 34:1879-1884.
- Erdö SL, 1984c. Postmortem increase of GABA levels in peripheral rat tissues: Prevention by 3-mercapto-propionic acid. *J Neural Transm* 60:303-314.
- Erdö SL, 1985. Peripheral GABAergic mechanisms. *Trends Pharmacol Sci* 6:205-208.
- Erdö SL, 1986. GABAergic mechanisms and their possible role in the oviduct and the uterus. En: *GABAergic Mechanisms in the Mammalian Periphery*. Erdö SL, Bowery NG (Ed), Raven Press, New York :205-222.
- Erdö SL, 1992. Non-neuronal GABA systems: an overview. En: *GABA Outside the CNS*. Erdö SL (Ed). Springer-Verlag, New York :97-110.
- Erdö SL, Amenta F, 1986. Characterization and localization of high-affinity GABA uptake in slides of the rabbit oviduct. *Eur J Pharmacol* 130:287-294.

- Erdő SL, Kiss B, 1986. Presence of GABA, glutamate decarboxylase, and GABA transaminase in peripheral tissues: a collection of quantitative data. En: GABAergic Mechanisms in the Mammalian Periphery. Erdő SL, Bowery NG (Eds) Raven Press, New York :5-17.
- Erdő SL, Lapis E, 1982. Bicuculline-sensitive GABA receptors in the rat ovary. *Eur J Pharmacol* 85:243-246.
- Erdő SL, László A, 1984. High specific  $\gamma$ -aminobutyric acid binding to membranes of the human ovary. *J Neurochem* 42:1464-1467.
- Erdő SL, Wekerle L, 1990. GABAA-type binding sites on membranes of spermatozoa. *Life Sci* 47:1147-1151.
- Erdő SL, Wolff JR, 1990.  $\gamma$ -Aminobutyric acid outside the mammalian brain. *J Neurochem* 54:363-372.
- Erdő SL, Rosdy B, Szporny L, 1982. Higher GABA concentrations in fallopian tube than in brain of the rat. *J Neurochem* 38:1174-1176.
- Erdő SL, Nemet I, Szporny L, 1983. The occurrence of GABA in vas deferens, prostate, epididymis, seminal vesicle and testicle of the rat. *Acta Biol Hung* 34:435-437.
- Erdő SL, Kiss B, Szporny L, 1984a. Comparative characterization of glutamate decarboxylase in crude homogenates of oviduct, ovary and hypothalamus. *J Neurochem* 43:1532-1537.
- Erdő SL, Riesz M, Kiss B, Szporny L, 1984b. Active GABA transport in the rabbit oviduct. En: Regulation of Transmitter Function: Basic and Clinical Aspects. Vizi ES, Magyar K (Eds), Akadémiai Kiadó, Budapest :84.
- Erdő SL, Riesz M, Kárpáti E, Szporny L, 1984c. GABAB receptor-mediated stimulation of the contractility of isolated rabbit oviduct. *Eur J Pharmacol* 99:333-336.
- Erdő SL, Varga B, Horvath E, 1985. Effect of local GABA administration on rat ovarian blood flow and on progesterone and estradiol secretion. *Eur J Pharmacol* 111:397-400.
- Erdő SL, Somogyi J, Hámori J, Amenta F, 1986. Light and electron microscopic visualization of  $\gamma$ -aminobutyric acid and GABA-transaminase within the rat oviduct: Predominant occurrence in epithelium. *Cell Tissue Res* 244:621-626.
- Erdő SL, Joo F, Wolff JR, 1989. Immunohistochemical localization of glutamate decarboxylase in the rat oviduct and ovary: further evidence for non-neural GABA systems. *Cell Tissue Res* 255:431-434.

- Espinoza F, De La Vega Beltran JL, Lopez Gonzalez I, Delgado R, Labarca P, Darszon A, 1998. Mouse-sperm patch-clamp recordings reveal single Cl<sup>-</sup> channels sensitive to niflumic acid, a blocker of the sperm acrosome reaction. *FEBS Letters* 426:47-51.
- Evans G, Maxwell WMC, 1987. Frozen storage of semen. En: Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. Butterworths Pty Ltd, Sydney :122-141.
- Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MP, 1982. Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. *J Histochem Cytochem* 30:279-280.
- Fabbri R, Porcu E, Lenzi A, Gandini L, Marsella T, Flamigni C, 1998. Follicular fluid and human granulosa cell cultures: influence on sperm kinetic parameters, hyperactivation, and acrosome reaction. *Fertil Steril* 69:112-117.
- Farrant M, Nusser Z, 2005. Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat Rev Neurosci* 6:215-229.
- Faulkner-Jones BE, Cram DS, Kun J, Harrison LC, 1993. Localization and quantitation of expression of two glutamate decarboxylase genes in pancreatic beta-cells and other peripheral tissues of mouse and rat. *Endocrinology* 133:2962-2972.
- Fawcett DW, 1965. The anatomy of the mammalian spermatozoon with particular reference to the guinea pig. *Z Zellforsch* 67:279-296.
- Fawcett DW, 1975. The mammalian spermatozoon. *Dev Biol* 44:394-436.
- Feigenspan A, Wassle H, Bormann J, 1993. Pharmacology of GABA receptor Cl<sup>-</sup> channels in rat retina bipolar cells. *Nature* 361:159-162.
- Feng HL, Hershlag A, Han YB, Zheng LJ, 2006. Localizations of intracellular calcium and Ca(2+)-ATPase in hamster spermatogenic cells and spermatozoa. *Microsc Res Tech* 69 : 618-623.
- Fenichel P, Gharib A, Emiliozzi C, Donzeau M, Menezo Y, 1996. Stimulation of human sperm during capacitation in vitro by an adenosine agonist with specificity for A2 receptors. *Biol Reprod* 54:1405-1411.
- Ferenci P, Covell D, Schafer DF, Waggoner JG, Shrager R, Jones EA, 1983. Metabolism of the inhibitory neurotransmitter  $\gamma$ -aminobutyric acid in a rabbit model of fulminant hepatic failure. *Hepatology* 3:507-512.
- Ferreira SA, Scott CJ, Kuehl DE, Jackson GL, 1996. Differential regulation of luteinizing hormone release by  $\gamma$ -aminobutyric acid receptor subtypes in the arcuate-ventromedial region of the castrated ram. *Endocrinology* 137:3453-3460.

- Fernandez-Pardal J, Gimeno MF, Gimeno AL, 1984. The presence of GABA in ovarian, tubal and uterine rat tissue and the influence of estrogens. *IRCS Med Sci* 12:706.
- Fernandez-Pascual S, Mukala-Nsengu-Tshibangu A, Martin Del Rio R, Tamarit-Rodriguez J, 2004. Conversion into GABA (gamma-aminobutyric acid) may reduce the capacity of L-glutamine as an insulin secretagogue. *Biochem J* 379:721-729.
- Feulgen R, Rossenbeck H, 1924. Mikroskopisch-chemischer nachweis einer nucleinsauer vom Typhus der Thymonucleinsaeure und die darauf bereuhnde elektive farbung von zellkernen in mikroskopischen preparaten. *Z Physiol Chem* 135:203-248.
- First NL, Parrish JJ, 1987. In vitro fertilization of ruminants. *J Reprod Fertil Suppl* 34:151-165.
- Fitz JG, Lidofsky SD, Scharschmidt BF, 1993. Regulation of hepatic Na(+)-HCO<sub>3</sub>-cotransport and pH by membrane potential difference. *Am J Physiol* 265:G1-G8.
- Fizman ML, Novotny EA, Lange GD, Barker JL, 1990. Embryonic and early postnatal hippocampal cells respond to nanomolar concentrations of muscimol. *Dev Brain Res* 53:186-193.
- Flaherty SP, Winfrey VP, Olson GE, 1986. Localization of actin in mammalian spermatozoa: A comparison of eighth species. *Anat Rec* 216:504-515.
- Flechon JE, Harrison RAP, Flechon B, Escaig J, 1986. Membrane fusion events in the Ca<sup>2+</sup>/ionophore-induced acrosome reaction of ram spermatozoa. *J Cell Sci* 81:43-63.
- Flemming AD, Yanagimachi R, 1982. Fertile life of acrosome-reacted guinea-pig spermatozoa. *J Exp Zool* 220:109-115.
- Flesch FM, Colenbrander B, van Golde LMG, Gadella BM, 1999. Capacitation induces tyrosine phosphorylation of proteins in the boar sperm plasma membrane. *Biochem Biophys Res Comm* 262:787-792.
- Florman HM, Corron ME, Kim TDH, Babcock DF, 1992. Activation of voltage-dependent calcium channels of mammalian sperm is required for zona-induced acrosomal exocytosis. *Dev Biol* 152:304-314.
- Florman HM, Arnoult C, Kazam IG, Lee C, O'Toole CMB, 1998. A perspective on the control of mammalian fertilization by egg-activated ion channels in sperm: A tale of two channels. *Biol Reprod* 59:12-16.

- Focarelli R, Giuffrida A, Rosati F, 1995. Changes in the sialyglycoconjugate distribution on the human sperm surface during in-vitro capacitation-partial purification of a 20 kDa sialyglycoprotein of capacitated spermatozoa. *Hum Reprod* 10:2755-2759.
- Fogel WA, Erdö SL, 1992. GABA and diamine oxidase activity in the gastrointestinal mucosa; possible links. En: *GABA Outside the CNS*. Erdö SL (Ed), Springer-Verlag, New York :133-142.
- Ford WC, 2004. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Hum Reprod Update* 10:387-399.
- Foresta C, Rossato M, Di Virgilio F, 1993. Ion fluxes through the progesterone-activated channel of the sperm plasma membrane. *Biochem J* 294:279-283.
- Forray MI, Hidalgo P, Diaz F, Belmar J, 1993. Non-neuronal endogenous GABA efflux from the rat oviduct. *Life Sci* 52:811-818.
- Fowler LJ, John RA, 1972. Active-site-directed irreversible inhibition of rat brain 4-aminobutyrate aminotransferase by ethanolamine-o-sulfate in vitro and in vivo. *Biochem J* 130:569-573.
- Fraire-Zamora JJ, Gonzalez-Martinez MT, 2004. Effect of intracellular pH on depolarization-evoked calcium influx in human sperm. *Am J Physiol Cell Physiol* 287:C1688-1696.
- Fraser LR, 1977. Motility patterns in mouse spermatozoa before and after capacitation. *J Exp Zool* 202:439-444.
- Fraser LR, 1981. Dibutiryl cyclic AMP decreases capacitation time in vitro in mouse spermatozoa. *J Reprod Fertil* 62:63-72.
- Fraser LR, 1982. Potential contraception by interference with capacitation. En: Jeffcoate SL, Sandler M (ed). *Progress Towards a Male Contraceptive*. Chichester. John Wiley & Sons :185-208.
- Fraser LR, 1983. Potassium ions modulate expression of mouse sperm fertilizing ability, acrosome reaction and hyperactivated motility in vitro. *J Reprod Fertil* 69:539-553.
- Fraser LR, 1990. Adenosine and its analogues, possibly acting at A2 receptors, stimulate mouse sperm fertilizing ability during early stages of capacitation. *J Reprod Fertil* 89:467-476.
- Fraser LR, 1995a. Cellular biology of capacitation and the acosome reaction. *Hum Reprod* 10 Suppl 1:22-30.

- Fraser LR, 1995b. Ionic control of sperm function. *Reprod Fertil Dev* 7:905-925.
- Fraser LR, 1998a. Sperm capacitation and the acrosome reaction. *Human Reprod* 13 Suppl 1:9-19.
- Fraser LR, 1998b. Modulation of mammalian sperm function by fertilization promoting peptide (FPP). *Andrologia* 30:241-247.
- Fraser LR, Adeoya-Osiguwa SA, 2001. Fertilization promoting peptide- a possible regulator of sperm function in vivo. *Vitam Horm* 63:1-28.
- Fraser LR, Herod JE, 1990. Expression of capacitation-dependent changes in chlortetracycline fluorescence patterns in mouse spermatozoa requires a suitable glycolysable substrate. *J Reprod Fertil* 88:611-621.
- Fraser LR, McDermott CA, 1992. Ca<sup>2+</sup>-related changes in the mouse sperm capacitation state: a possible role for Ca<sup>2+</sup> ATPase. *J Reprod Fertil* 96:363-377.
- Fraser LR, Abeydeera LR, Niwa K, 1995. Ca<sup>2+</sup>-regulating mechanism that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis. *Mol Reprod Dev* 40:233-241.
- Fraser LR, Hosseini R, Hanyaloglu A, Talmor A, Dudley RK, 1997. TCP-11, the product of a mouse t-complex gene, plays a role in stimulation of capacitation and inhibition of the spontaneous acrosome reaction. *Mol Reprod Dev* 48:375-382.
- Fraser L, Gorszczaruk K, Strzezek J, 2001. Relationship between motility and membrane integrity of boar spermatozoa in media varying in osmolality. *Reprod Domest Anim* 36:325-329.
- Fraser LR, Adeoya-Osiguwa S, Baxendale RW, Mededovic S, Osiguwa OO, 2005. First messenger regulation of mammalian sperm function via adenylyl cyclase/cAMP. *J Reprod Dev* 51:37-46.
- Friend DS, 1982. Plasma-membrane diversity in a highly polarized cell. *J Cell Biol* 93:243-249.
- Frungeri MB, Gonzalez-Calvar SI, Calandra RS, 1996. Influence of photoinhibition on GABA and glutamic acid levels, and on glutamate decarboxylase activity in the testis and epididymis of the golden hamster. *Int J Androl* 19:171-178.
- Fuentes-Mascorro G, Serrano H, Rosado A, 2000. Sperm chromatin. *Arch Androl* 45:215-225.
- Fujii E, Mellon SH, 2001. Regulation of uterine gamma-aminobutyric acid(A) receptor subunit expression throughout pregnancy. *Endocrinology* 142:1770-1777.

- Fukuda M, Morales P, Overstreet JW, 1989. Acrosomal function of human spermatozoa with normal and abnormal head morphology. *Gamete Res* 24:59-65.
- Fukui Y, Glew AM, Gandolfi F, Moor RM, 1988. Ram-specific effects on in-vitro fertilization and cleavage of sheep oocytes matured in vitro. *J Reprod Fertil* 82:337-340.
- Funahashi H, Asano A, Fujiwara T, Nagai T, Niwa K, Fraser LR, 2000. Both fertilization promoting peptide and adenosine stimulate capacitation but inhibit spontaneous acrosome loss in ejaculated boar spermatozoa in vitro. *Mol Reprod Dev* 55:117-124.
- Furuya S, Endo Y, Oba M, Suzuki S, 1992. Effects of modulators of protein kinases and phosphatases on mouse sperm capacitation. *J Assist Reprod Genetics* 9:391-399.
- Furuya S, Endo Y, Oba M, Suzuki S, 1993. Effects of modulators of protein kinase C on human sperm capacitation. *Fertil Steril* 59:1285-1290.
- Gadella BM, Harrison RA, 2000. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development* 127:2407-2420.
- Gadella BM, Harrison RA, 2002. Capacitation induces cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. *Biol Reprod* 67:340-350.
- Gadella BM, van Gestel RA, 2004. Bicarbonate and its role in mammalian sperm function. *Anim Reprod Sci* 82/83:307-319.
- Galantino-Homer HL, Visconti PE, Kopf GS, 1997. Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent pathway. *Biol Reprod* 56:707-719.
- Galantino-Homer HL, Florman HM, Storey BT, Dobrinski I, Kopf GS, 2004. Bovine sperm capacitation: assessment of phosphodiesterase activity and intracellular alkalization on capacitation-associated protein tyrosine phosphorylation. *Mol Reprod Dev* 67:487-500.
- Gamel-Didelon K, Corsi C, Pepeu G, Jung H, Gratzl M, Mayerhofer A, 2002. An autocrine role for pituitary GABA: activation of GABA-B receptors and regulation of growth hormone levels. *Neuroendocrinology* 76:170-177.
- Gamel-Didelon K, Kunz L, Fohr KJ, Gratzl M, Mayerhofer A, 2003. Molecular and physiological evidence for functional gamma-aminobutyric acid (GABA)-C receptors in growth hormone-secreting cells. *J Biol Chem* 278:20192-20195.

- García MA, Meizel S, 1999a. Regulation of intracellular pH in capacitated human spermatozoa by a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *Mol Reprod Dev* 52:189-195.
- García MA, Meizel S, 1999b. Determination of the steady-state intracellular chloride concentration in capacitated human spermatozoa. *J Androl* 20:88-93.
- Garner DL, Hafez ESE, 1992. Espermatozoides y plasma seminal. En: *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales* (Hafez ESE, Ed). Interamericana Mc Graw-Hill, México. Quinta Edición :205-226.
- Garner DL, Pinkel D, Johnson LA, Pace MM, 1986. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biol Reprod* 34:127-138.
- Garty NB, Salomon Y, 1987. Stimulation of partially purified adenylate cyclase from bull sperm by bicarbonate. *FEBS Lett* 218:148-152.
- Garty NB, Galiani D, Aharonheim A, Ho YK, Phillips DM, Dekel N, Salomon Y, 1988. G-proteins in mammalian gametes: An immunocytochemical study. *J Cell Sci* 91 : 21-31.
- Gaskins HR, Baldeon ME, Selassie L, Beverly JL, 1995. Glucose modulates gamma-aminobutyric acid release from the pancreatic beta TC6 cell line. *J Biol Chem* 270:286-289.
- Geigerseder C, Doepner R, Thalhammer A, Frungieri MB, Gamel-Didelon K, Calandra RS, Kohn FM, Mayerhofer A, 2003. Evidence for a GABAergic system in rodent and human testis: local GABA production and GABA receptors. *Neuroendocrinology* 77:314-323.
- Gerber JC, Hare TA, 1980. GABA in peripheral tissues: Presence and actions in endocrine function. *Brain Res Bull* 5:341-346.
- Gilon P, Remacle C, 1992. GABA and endocrine cells of the gastro-entero-pancreatic system: a review. En: *GABA Outside the CNS*. Erdö SL (Ed), Springer-Verlag, New York :111-132.
- Gilon P, Bertrand G, Loubathieres-Mariani MM, Remacle C, Henquin JC, 1991. The influence of gamma-aminobutyric acid on hormone release by the mouse and rat endocrine pancreas. *Endocrinology* 129:2521-2529.
- Gimeno MF, Fernandez-Pardal J, Viggiano M, Pezzot MC, Gimeno AL, 1986. On the presence of GABA in ovarian, tubal and uterine rat tissues. Modification at different



stages of the estrous cycle and during pregnancy. *Adv Biochem Psychopharmacol* 42:275-282.

-Ginsburg KA, Moghissi KS, Abel EL, 1988. Computer-Assisted human semen analysis. Sampling errors and reproducibility. *J Androl* 9:82-90.

-Gladkevich A, Korf J, Hakobyan VP, Melkonyan KV, 2006. The peripheral GABAergic system as a target in endocrine disorders. *Auton Neurosci* 124:1-8.

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

-Glazzard AN, Hirons MR, Mellor JS, Holwill MEJ, 1983. The computer assisted analysis of television images as applied to the study of cell motility. *J Submicrosc Cytol* 15:305-308.

-Gomez E, Irvine S, Aitken J, 1996. Diagnóstico de la función espermática. En: Remohi J, Simon C, Pellicer A, Bonilla-Musoles F, Reproducción Humana. Mc Graw-Hill/ Interamericana de España, Madrid :101-119.

-Gonzalez-Martinez MT, Bonilla-Hernandez MA, Guzman-Grenfell AM, 2002. Stimulation of voltage-dependent calcium channels during capacitation and by progesterone in human sperm. *Arch Biochem Biophys*;408:205-210.

-Goodyer PR, Lancaster G, Villeneuve M, Scriver CR, 1980. The relationship of 4-aminobutyric acid metabolism to ammoniogenesis in renal cortex. *Biochim Biophys Acta* 633:191-200.

-Goodyer PR, Mills M, Scriver CR, 1982. Properties of  $\gamma$ -aminobutyric acid synthesis by rat renal cortex. *Biochim Biophys Acta* 716:348-357.

-Gottlieb DI, 1988. GABAergic neurons. *Sci Am* 258:38-45.

-Grace KS, Bronson RA, Ghebrehiwet B, 2002. Surface expression of complement receptor gC1q-R/p33 is increased on the plasma membrane of human spermatozoa after capacitation. *Biol Reprod* 66:823-829.

-Graham LT, Aprison MH, 1966. Fluorometric determination of aspartate, glutamate and  $\gamma$ -aminobutyrate in nerve tissue using enzymatic methods. *Anal Biochem* 15:487-497.

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

- Green CM, Cockle SM, Watson PF, Fraser LR, 1996a. Fertilization promoting peptide, a tripeptide similar to thyrotrophin-releasing hormone, stimulates the capacitation and fertilizing ability of human spermatozoa in vitro. *Hum Reprod* 11:830-836.
- Green CM, Cockle SM, Watson PF, Fraser LR, 1996b. A possible mechanism of action for fertilization promoting peptide, a TRH-related tripeptide that promotes capacitation and fertilizing ability in mammalian spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 45:244-252.
- Griveau JF, Renard P, LeLannou D, 1994. An in vitro promoting role for hydrogen peroxide in human sperm capacitation. *Int J Androl* 17:300-307.
- Gualtieri R, Boni R, Tosti E, Zagami M, Talevi R, 2005. Intracellular calcium and protein tyrosine phosphorylation during the release of bovine sperm adhering to the fallopian tube epithelium in vitro. *Reproduction* 129:51-60.
- Guerin P, Ferrer M, Fontbonne A, Benigni L, Jacquet M, Menezo Y, 1999. In vitro capacitation of dog spermatozoa as assessed by chlortetracycline staining. *Theriogenology* 52:617-628.
- Gur Y, Breitbart H, Lax Y, Rubinstein S, Zamir N, 1998. Angiotensin II induces acrosomal exocytosis in bovine spermatozoa. *Am J Physiol Endocrinol Metabolism* 38:E87-E93.
- Gutierrez A, Garde J, García-Artiga C, Vazquez I, 1993. Ram spermatozoa cocultured with epithelial cell monolayers: an in vitro model for the study of capacitation and the acrosome reaction. *Mol Reprod Dev* 36:338-345.
- Haber B, Kuriyama K, Roberts E, 1970. An anion stimulated L-glutamic acid decarboxylase in non-neural tissues. *Biochem Pharmacol* 19:1119-1136.
- Hall JA, Calogero AE, Fishel SB, 1996. Effect of gamma-aminobutyric acid (GABA) on human sperm acrosome reaction. *J Reprod Fertil (Abstr Ser)* 17:27.
- Hallet M, Schneider AS, Carbone E, 1972. Tetracycline fluorescence as calcium-probe for nerve membrane with some studies using erythrocyte ghosts. *J Membr Biol* 10:31-44.
- Handrow RR, Lenz RW, Ax RL, 1982. Structural comparisons among glycosaminoglycans to promote an acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Biochem Biophys Res Comm* 107:1326-1332.
- Hancock JL, 1951. A staining technique for the study of temperature shock in semen. *Nature* 167:323-324.

- Happola O, Karhula T, Paivarinta H, Soinila S, Wu J-Y, Ahonen M, 1992. L-glutamate decarboxylase immunoreactivity in the sympathoadrenal system. En: GABA Outside the CNS. Erdö SL (Ed), Springer-Verlag, New York :65-82.
- Harrison RAP, 1996. Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in Eutherian Mammals. *Reprod Fertil Dev* 8:581-594.
- Harrison RA, 2004. Rapid PKA-catalysed phosphorylation of boar sperm proteins induced by the capacitating agent bicarbonate. *Mol Reprod Dev* 67:337-352.
- Harrison RA, Gadella BM, 2005. Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. *Theriogenology* 63:342-351.
- Harrison RA, Miller NG, 2000. cAMP-dependent protein kinase control of plasma membrane lipid architecture in boar sperm. *Mol Reprod Dev* 55:220-228.
- Harrison RAP, Vickers SE, 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fert* 88:343-352.
- Harrison RA, Ashworth PJ, Miller NG, 1996. Bicarbonate/CO<sub>2</sub>, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. *Mol Reprod Dev* 45:378-391.
- Hayashi T, Nagai K, 1956. Action of  $\omega$ -amino acids on the motor cortex of higher animals, especially  $\gamma$ -amino- $\beta$ -oxy-butyric acid as the real inhibitory principle in brain. En: 20th International Physiology Congress, Brussels :410.
- He XB, Hu JH, Wu Q, Yan YC, Koide SS, 2001. Identification of GABA(B) receptor in rat testis and sperm. *Biochem Biophys Res Commun* 283:243-247.
- He X, Zhang Y, Yan Y, Li Y, Koide SS, 2003. Identification of GABABR2 in rat testis and sperm. *J Reprod Dev* 49:397-402.
- Hedblom E, Kirkness EF, 1997. A novel class of GABAA receptor subunit in tissues of the reproductive system. *J Biol Chem* 272:15346-15350.
- Hernandez EO, Trejo R, Espinosa AM, Gonzalez A, Mujica A, 1994. Calmodulin binding proteins in the membrane vesicles released during the acrosome reaction and in the perinuclear material in isolated acrosome reacted sperm heads. *Tissue Cell* 26:849-865.
- Hernandez-Tristan R, Leret ML, Almeida D, 2006. Effect of intrauterine position on sex differences in the gabaergic system and behavior of rats. *Physiol Behav* 87:625-633.
- Herrero MB, de Lamirande E, Gagnon C, 1999. Nitric oxide regulates human sperm capacitation and protein-tyrosine phosphorylation in vitro. *Biol Reprod* 61:575-581.

- Herrero MB, Chatterjee S, Lefievre L, de Lamirande E, Gagnon C, 2000. Nitric oxide interacts with the camp pathway to modulate capacitation of human spermatozoa. *Free Radic Biol Med* 29:522-536.
- Hess KC, Jones BH, Marquez B, Chen Y, Ord TS, Kamenetsky M, Miyamoto C, Zippin JH, Kopf GS, Suarez SS, Levin LR, Williams CJ, Buck J, Moss SB, 2005. The "soluble" adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization. *Dev Cell* 9:249-259.
- Hewitt DA, England GCW, 1998. An investigation of capacitation and the acrosome reaction in dog spermatozoa using a dual fluorescent staining technique. *Anim Reprod Sci* 51:321-332.
- Hill DR, Bowery NG, 1981. 3H-Baclofen and 3H-GABA bind to bicuculline insensitive GABA sites in rat brain. *Nature* 290:149-152.
- Hinsch E, Ponce AA, Hagele W, Hedrich F, 1997. A new combined in-vitro test model for the identification of substances affecting essential sperm functions. *Hum Reprod* 12:1673-1681.
- Hinsch E, Aires VA, Hedrich F, Oehninger S, Hinsch KD, 2005. A synthetic decapeptide from a conserved ZP3 protein domain induces the G protein-regulated acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Theriogenology* 63:1682-1694.
- Ho HC, Suarez SS, 2001. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. *Reproduction* 122:519-526.
- Ho HC, Suarez SS, 2003. Characterization of the intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates hyperactivated motility. *Biol Reprod* 68:1590-1596.
- Ho HC, Granish KA, Suarez SS, 2002. Hyperactivated motility of bull sperm is triggered at the axoneme by Ca<sup>2+</sup> and not cAMP. *Dev Biol* 250:208-217.
- Hodgson AJ, Penke B, Erdei A, Chubb IW, Somogyi P, 1985. Antisera to  $\gamma$ -aminobutyric acid: I. Production and characterization using a new model system. *J Histochem Cytochem* 33:229-240.
- Holden CA, Trounson AO, 1992. Influence of a capacitation period on human sperm acrosome loss. *J Exp Zool* 264:468-474.
- Holden CA, Hyne RV, Sathananthan AH, Trounson AO, 1990. Assessment of the human sperm acrosome reaction using concanavalin A lectin. *Mol Reprod Dev* 25:247-257.

- Holt WV, 1984. Membrane heterogeneity in the mammalian spermatozoon. En: Bourne GH, Danielli JF (eds), International Review of Cytology, Vol 54, Academic Press, New York:159-194.
- Holt WV, 1995. The sperm plasma membrane. En: Fénichel P, Parinaud J (eds) Human Sperm Acrosome Reaction. Colloque INSERM n° 236. Paris, France: John Libbey Eurotext Ltd :1-16.
- Holt WV, North RD, 1985. Determination of lipid composition and thermal phase transitions temperature in an enriched plasma membrane fraction from ram spermatozoa. J Reprod Fert 73:285-294.
- Holt WV, North RD, 1986. Thermotropic phase transitions in the membrane of ram spermatozoa. J Reprod Fertil 78:447-457.
- Holt WV, Head, MF, North RD, 1992. Freeze-induced damage in ram spermatozoa is manifested after thawing: observations with experimental cryomicroscopy. Biol Reprod 46:1086-1094.
- Holt W, Watson P, Curry M, Holt C, 1994. Reproducibility of computer-aided semen analysis: comparison of five different systems used in a practical workshop. Fertil Steril 62:1277-1282.
- Howes L, Jones R, 2002. Interactions between zona pellucida glycoproteins and sperm proacrosin/acrosin during fertilization. J Reprod Immunol 53:181-192.
- Hu JH, He XB, Wu Q, Yan YC, Koide SS, 2002a. Subunit composition and function of GABAA receptors of rat spermatozoa. Neurochem Res 27:195-199.
- Hu JH, He XB, Wu Q, Yan YC, Koide SS, 2002b. Biphasic effect of GABA on rat sperm acrosome reaction: involvement of GABA(A) and GABA(B) receptors. Arch Androl 48:369-378.
- Huneau D, Crozet N, Ahmed-Ali M, 1994. Estrous sheep serum as a potent agent for ovine IVF: Effect on cholesterol efflux from spermatozoa and the acrosome reaction. Theriogenology 42:1017-1028.
- Hunnicuttt GR, Koppel DE, Myles DG, 1997. Analysis of the process of localization of fertilin to the sperm posterior head plasma membrane domain during sperm maturation in the epididymis. Rev Biol 191:146-159.
- Hunter RHF, 1987. Perioviductal physiology of the oviduct, with special reference to progression, storage and capacitation of spermatozoa. En: Mohri H (ed), New Horizons

in Sperm Cell Research. New York: Japan Sci Soc Press, Tokyo/Gordon and Breach Sci Publ :31-45.

-Hunter RHF, Wilmut I, 1984. Sperm transport in the cow: periovulatory redistribution of viable cells within the oviduct. *Reprod Nutr Dev* 24:597-608.

-Huo LJ, Yue KZ, Yang ZM, 2002. Characterization of viability, mitochondrial activity, acrosomal integrity and capacitation status in boar sperm during in vitro storage at different ambient temperatures. *Reprod Fertil Dev* 14:509-514.

-Hyne RV, Higginson RE, Kohlman D, Lopata A, 1984. Sodium requirement for capacitation and membrane fusion during the guinea-pig sperm acrosome reaction. *J Reprod Fertil* 70:83-94.

-Hynie J, 1962. A quick calculation of the velocity of spermatozoa. *Int J Fertil* 7:345-346.

-Ignotz GG, Suarez SS, 2005. Calcium/Calmodulin and Calmodulin Kinase II Stimulate Hyperactivation in Demembrated Bovine Sperm. *Biol Reprod* 73:519-526.

-Ikeda H, Kikuchi K, Noguchi J, Takeda H, Shimada A, Mizokami T, Kaneko H, 2002. Effect of preincubation of cryopreserved porcine epididymal sperm. *Theriogenology* 57:1309-1318.

-Isaacson JS, 2001. Mechanisms governing dendritic gamma-aminobutyric acid (GABA) release in the rat olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:337-342.

-Ishii N, Mitsukawa S, Shirai M, 1977. Sperm motility efficiency. *Andrologia* 9:55-62.

-Jakobs C, Jaeken J, Gibson KM, 1993. Inherited disorders of GABA metabolism. *J Inher Metab Dis* 16:704-715.

-Jamil K, White IG, 1981. Induction of acrosomal reaction in sperm with ionophore A23187 and calcium. *Arch Androl* 7:283-292.

-Janick J, MacLeod J, 1970. The measurement of human spermatozoan motility. *Fertil Steril* 21:140-146.

-Januskauskas A, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H, 2003. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. *Theriogenology* 60:743-758.

-Jelitai M, Madarasz E, 2005. The role of GABA in the early neuronal development. *Int Rev Neurobiol* 71:27-62.

- Jelitai M, Anderova M, Marko K, Kekesi K, Koncz P, Sykova E, Madarasz E, 2004. Role of gamma-aminobutyric acid in early neuronal development: studies with an embryonic neuroectodermal stem cell clone. *J Neurosci Res* 76:801-811.
- Jenks JP, Cosentino MJ, Cockett ATK, 1982. Evaluating sperm motility: a comparison of the Rochester motility scoring system versus videomicrography. *Fertil Steril* 38:756-759.
- Jeulin C, Serres C, Jouannet P, 1982. The effects of centrifugation, various synthetic media and temperature on the motility and vitality of human spermatozoa. *Reprod Nutr Dev* 22:81-91.
- Jessen KR, Mirsky R, Dennison ME, Burnstock G, 1979. GABA may be a neurotransmitter in the vertebrate peripheral nervous system. *Nature* 281:71-74.
- Jeyendran RS, Van der Ven HH, Pérez-Pelaez M, Grabo BG, Zaneveld LJD, 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil* 70:219-225.
- Jia ZY, Yuan YY, Shi QX, 1997. The transducing pathway of Ca<sup>2+</sup> influx during progesterone-initiated acrosome reaction of guinea pig sperm. *Sheng Li Hsueh Pao* 49:349-353.
- Jimenez I, Gonzalez-Marquez H, Ortiz R, Betancourt M, Herrera J, Fierro R, 2002. Expression of lectin receptors on the membrane surface of sperm of fertile and subfertile boars by flow cytometry. *Arch Androl* 48:159-166.
- Jimenez I, Gonzalez-Marquez H, Ortiz R, Herrera JA, Garcii A, Betancourt M, Fierro R, 2003. Changes in the distribution of lectin receptors during capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa. *Theriogenology* 59:1171-1180.
- Johnson LN, Barford D, 1993. The effects of phosphorylation on the structure and function of proteins. *Annu Rev Biophys Struct* 22:199-232.
- Johnson MH, 1975. The macromolecular organization of membranes and its bearing on events leading up to fertilization. *J Reprod Fertil* 44:167-284.
- Johnston GA, Chebib M, Hanrahan JR, Mewett KN, 2003. GABA(C) receptors as drug targets. *Curr Drug Target CNS Neurol Disord* 2:260-268.
- Johnston GAR, 1994. GABA receptors-as complex as ABC? *Clin Exp Pharmacol Physiol* 21:521-526.
- Johnston GAR, 1996. GABAA receptor pharmacology. *Pharmacol Ther* 69:173-198.

- Johnston GAR, Balkar VJ, 1989. GABA enzymes and transport systems. En: GABA: Basic Research to Clinical Implications. Bowery NG, Nistico G (eds) Pythagora Press, Rome : 1-23.
- Jones HP, Lenz RW, Palevitz BA, Cormier MJ, 1980. Calmodulin localization in mammalian spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:2772-2776.
- Jones R, Shalgi R, Hoyland J, Phillips DM, 1990. Topographical rearrangement of a plasma membrane antigen during capacitation of rat spermatozoa in vitro. *Dev Biol* 139:349-362.
- Jouannet P, Volochine B, Deguent P, Serres S, David G, 1977. Light scattering determination of various characteristic parameters of spermatozoa motility in a series of human sperm. *Andrologia* 9:36-49.
- Kalab P, Peknicova J, Geussova G, Moss J, 1998. Regulation of protein tyrosine phosphorylation in boar sperm through a cAMP-dependent pathway. *Mol Reprod Dev* 51:304-314.
- Kameshwari DB, Siva AB, Shivaji S, 2003. Inhibition of in vitro capacitation of hamster spermatozoa by nitric oxide synthase inhibitors. *Cell Mol Biol* 49:421-428.
- Kanbara K, Okamoto K, Nomura S, Kaneko T, Shigemoto R, Azuma H, Katsuoka Y, Watanabe M, 2005. Cellular localization of GABA and GABAB receptor subunit proteins during spermiogenesis in rat testis. *J Androl* 26:485-493.
- Kaneto M, Harayama H, Miyake M, Kato S, 2002. Capacitation-like alterations in cooled boar spermatozoa: assessment by the chlortetracycline staining assay and immunodetection of tyrosine-phosphorylated sperm proteins. *Anim Reprod Sci* 73:197-209.
- Kardos J, 1999. Recent advances in GABA research. *Neurochem Int* 34:353-358.
- Kasten FH, 1964. The Feulgen reaction-An enigma in cytochemistry. *Acta Histochem* 17:88-99.
- Kataoka Y, Gutman Y, Guidotti A, Panula P, Wroblewski J, Cosenza-Murphy D, Wu J-Y, Costa E, 1984. Intrinsic GABAergic system of adrenal chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:3218-3222.
- Katayama M, Koshida M, Miyake M, 2002. Fate of the acrosome in ooplasm in pigs after IVF and ICSI. *Hum Reprod* 17:2657-2664.
- Katz DF, Overstreet JW, 1981. Sperm motility assessment by videomicrography. *Fertil Steril* 35:188-193.



- Katz DF, Yanagimachi R, 1980. Movement characteristics of hamster spermatozoa within the oviduct. *Biol Reprod* 22:759-764.
- Katz DF, Yanagimachi R, Dresder RD, 1978. Movement characteristics and power output of guinea-pig and hamster spermatozoa in relation to activation. *J Reprod Fertil* 52:167-172.
- Katz DF, Davis RO, Delandmeter BA, Overstreet JW, 1985. Real time analysis of sperm motion using automatic video image digitalization. *Comp Meth Prog Biomed* 21:173-182.
- Katz DF, Drobnis EZ, Overstreet JW, 1989. Factors regulating mammalian sperm migration through the female reproductive tract and oocyte vestments. *Gamete Res* 22:443-469.
- Katz DF, Morales P, Samuels SJ, Overstreet JW, 1990. Mechanisms of filtration of morphologically abnormal human sperm by cervical mucus. *Fertil Steril* 54:513-516.
- Kaul G, Singh S, Gandhi KK, Anand SR, 1997. Calcium requirement and time course of capacitation of goat spermatozoa by chlortetracycline assay. *Andrologia* 29:243-251.
- Kaul G, Sharma GS, Singh S, Gandhi KK, 2001. Capacitation and acrosome reaction in buffalo bull spermatozoa assessed by chlortetracycline and *Pisum sativum* agglutinin fluorescence assay. *Theriogenology* 55:1457-1468.
- Kawakami E, Vandevort CA, Mahi-Brown CA, Tollner TL, Overstreet JW, 1993. Comparison of a fluoresceinated lectin stain with triple staining for evaluating acrosome reaction of dog sperm. *J Exp Zool* 265:599-603.
- Kawakami E, Hori T, Tsutsui T, 1998. Induction of dog sperm capacitation by oviductal fluid. *J Vet Med Sci* 60:197-202.
- Kay VJ, Robertson L, 1998. Hyperactivated motility of human spermatozoa: a review of physiological function and application in assisted reproduction. *Human Reprod Update* 4:776-786.
- Kay VJ, Coutts JRT, Robertson L, 1994. Effects of pentoxifylline and progesterone on human sperm capacitation and acrosome reaction. *Hum Reprod* 9:2318-2323.
- Keel BA, Webster BW, Roberts DK, 1987. Effects of cryopreservation on the motility characteristics of human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 81:213-220.
- Kerr DIB, Ong J, 1992. GABA and gut motility. En: *GABA Outside the CNS*. Erdö SL (Ed), Springer-Verlag, New York, :29-44.

- Kerr DIB, Ong J, Prager RH, Gynther BD, Curtis DR, 1987. Phaclofen: a peripheral and central baclofen antagonist. *Brain Res* 405:150-154.
- Kholkute SD, Lian Y, Roudebush WE, Dukelow WR, 1990. Capacitation and acrosome reaction in squirrel monkey (*Saimiri sciureus*) spermatozoa evaluated by the chlortetracycline fluorescence assay. *Am J Primatol* 20:115-125.
- Kholkute SD, Meherji P, Puri CP, 1992. Capacitation and the acrosome reaction in sperm from men with various semen profiles monitored by a chlortetracycline fluorescence assay. *Int J Androl* 15:43-53.
- Kholkute SD, Rodriguez J, Dukelow WR, 1995. In vitro fertilization and the effect of progesterone and  $17\alpha$ -hydroxyprogesterone on acrosome reaction of the mouse epididymal spermatozoa. *Int J Androl* 18:146-150.
- Kim NH, Day BN, Lim JG, Lee HT, Chung KS, 1997. Effects of oviductal fluid and heparin on fertility and characteristics of porcine spermatozoa. *Zygote* 5:61-65.
- King RS, Anderson SH, Killian GJ, 1994. Effect of bovine oviductal estrus-associated protein on the ability of sperm to capacitate and fertilize oocytes. *J Androl* 15:468-478.
- Kinukawa M, Nagata M, Aoki F, 2003. Changes in flagellar bending during the course of hyperactivation in hamster spermatozoa. *Reproduction* 125:43-51.
- Kirischuk S, Akyeli J, Iosub R, Grantyn R, 2003. Pre- and postsynaptic contribution of GABAC receptors to GABAergic synaptic transmission in rat collicular slices and cultures. *Eur J Neurosci* 18:752-758.
- Kitamura K, Nishimura H, Nishimune Y, Tanaka H, 2005a. Identification of human HAPRIN potentially involved in the acrosome reaction. *J Androl* 26:511-518.
- Kitamura K, Tanaka H, Nishimune Y, 2005b. The RING-finger protein haprin: domains and function in the acrosome reaction. *Curr Protein Pept Sci* 6:567-574.
- Kitiyant Y, Chaisalee B, Pavasuthipaisit K, 2002. Evaluation of the acrosome reaction and viability in buffalo spermatozoa using two staining methods: the effects of heparin and calcium ionophore A23187. *Int J Androl* 25:215-222.
- Koehler JK, 1978. The mammalian sperm surface: Studies with specific labeling techniques. En: Bourne GH, Danielli JF (eds); *International review of cytology*, vol 54, Academic Press, New York:73-108.
- Koothan TP, van Duin M, Aitken RJ, 1993. Cloning, sequencing and oocyte-specific expression of the marmoset sperm receptor protein, ZP3. *Zygote* 1:93-101.

- Kopf GS, Gerton GL, 1991. Evidence for a guanine nucleotide-binding regulatory protein in vertebrate and mammalian sperm: identification of islet-activating protein-catalyzed ADP ribosylation and immunochemical methods. En: Wassarman PM (ed). Elements of Mammalian Fertilization Vol 1. Boca Raton, FL, CRC Press, Boston, MA, USA :153-203.
- Kraemer M, Fillion C, Martin-Pont B, Auger J, 1998. Factors influencing human sperm kinematic measurements by the CellTrak computer-assisted sperm analysis system. Hum Reprod 13:611-619.
- Krantis A, 2000. GABA in the Mammalian Enteric Nervous System. News Physiol Sci 15:284-290.
- Krause W, 1995. The significance of computer-assisted semen analysis (CASA) for diagnosis in andrology and fertility prognosis. Int J Androl 18 Suppl 2:32-35.
- Krausz C, Gervasi G, Forti G, Forti E, 1994. Effect of platelet-activating factor on motility and acrosome reaction of human spermatozoa. Hum Reprod 9:471-476.
- Kuffler SW, Edwards C, 1958. Mechanism of gamma aminobutyric acid (GABA) action and its relation to synaptic inhibition. J Neurophysiol 21:589-610.
- Kuji N, Tanaka Y, Komatsu S, Yoshimura Y, 2005. Protein kinase A activity and protein phosphorylation during the mouse sperm acrosomal reaction. Arch Androl 51:55-64.
- Kulanand J, Shivaji S, 2001. Capacitation-associated changes in protein tyrosine phosphorylation, hyperactivation and acrosome reaction in hamster spermatozoa. Andrologia 33:95-104.
- Kulin S, Bastiaans BA, Hollanders HMG, Jansen HJG, Goverde HJM, 1994. Human serum and follicular fluid stimulate hyperactivation of human spermatozoa after preincubation. Fertil Steril 62:1234-1237.
- Kuroda Y, Kaneko S, Yoshimura Y, Nozawa S, Mikoshiba K, 1999. Influence of progesterone and GABAA receptor on calcium mobilization during human sperm acrosome reaction. Arch Androl 42:185-191.
- Lambert JJ, Belelli D, Hill-Venning C, Peters JA, 1995. Neurosteroids and GABAA receptor function. Trends Pharmacol Sci 16:295-303.
- Lancaster G, Mohyuddin F, Scriver CR, Whelan DT, 1973. A  $\gamma$ -aminobutyrate pathway in mammalian kidney cortex. Biochim Biophys Acta 297:229-240.

- Lane ME, Thérien I, Moreau R, Manjunath P, 1999. Heparin and high density lipoprotein mediate bovine sperm capacitation by different mechanisms. *Biol Reprod* 60:169-175.
- Lapointe S, Sirard MA, 1996. Importance of calcium for the binding of oviductal fluid proteins to the membranes of bovine spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 44:234-240.
- Larson JL, Miller DJ, 1999. Simple histochemical stain for acrosomes on sperm from several species. *Mol Reprod Dev* 52:445-449.
- Laszlo A, Nadasy GL, Erdo SL, Monos E, Soklosi G, Zsolnai B, 1990. Effects of GABA on the spontaneous muscular activity of the human Fallopian tube ampullar segments in vitro. *Acta Physiol Hung* 76:123-130.
- Laszlo A, Nadasy GL, Monos E, Zsolnai B, Erdo SL, 1992. The GABAergic system in human female genital organs. En: Erdo SL (ed). *GABA Outside the CNS*. New York. Springer-Verlag :183-197.
- Lax Y, Grossman S, Rubinstein S, Magid N, Breitbart H, 1990. Role of lipoxygenase in the mechanism of the acrosome reaction in mammalian spermatozoa. *Biochem Biophys Acta* 1043:12-18.
- Lax Y, Rubinstein S, Breitbart H, 1994. Epidermal growth factor induces acrosomal exocytosis in bovine sperm. *FEBS Lett* 339:234-238.
- Leader A, Minuck GY, Mortimer D, 1992. Seminal plasma gamma-aminobutyric acid (GABA) levels in normospermic men. *Clin Invest Med* 15:346-348.
- Leclerc P, Goupil S, 2000. Distribution and localization of calmodulin-binding proteins in bull spermatozoa *Biol Reprod* 62:1875-1881.
- Leclerc P, Sirard MA, Chafouleas JG, Lambert RD, 1992. Decrease in calmodulin concentrations during heparin-induced capacitation in bovine spermatozoa. *J Reprod Fertil* 94:23-32.
- Leclerc P, de Lamirande E, Gagnon C, 1996. c-AMP-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility. *Biol Reprod* 55:684-692.
- Leclerc P, de Lamirande E, Gagnon C, 1997. Regulation of protein tyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen derivatives. *Free Rad Biol Med* 22:643-656.
- Lee MA, Damjanov I, 1985. Lectin binding sites on human sperm and spermatogenic cells. *Anat Rec* :212-287.

- Lee MA, Trucco GS, Bechtol KS, Wummer N, Kopf GS, Blasco L, Storey BT, 1987. Capacitation and acrosome reactions in human spermatozoa monitored by a chlortetracycline fluorescence assay. *Fertil Steril* 48:649-458.
- Lefièvre L, de Lamirande E, Gagnon C, 1999. Reactive oxygen species regulates the level of cAMP in human spermatozoa by inhibiting sperm phosphodiesterase activity during capacitation. *J Androl Supplement*, Abstract 78:45.
- Leyton L, Saling P, 1989a. 95 kd sperm proteins binds ZP3 and serve as tyrosine kinase substrates in response to zona binding. *Cell* 57:1123-1130.
- Leyton L, Saling P, 1989b. Evidence that aggregation of mouse sperm receptors by ZP3 triggers the acrosome reaction. *J Cell Biol* 108:2163-2168.
- Lieb K, Reisert I, Pilgrim C, 1994. Differentiation of hypothalamic GABAergic neurons in vitro: absence of effects of sex and gonadal steroids. *Exp Brain Res* 99:435-440.
- Linares-Hernandez L, Guzman-Grenfell AM, Hicks-Gomez JJ, Gonzalez-Martinez MT, 1998. Voltage-dependent calcium influx in human sperm assessed by simultaneous optical detection of intracellular calcium and membrane potential. *Biochim Biophys Acta* 1372:1-12.
- Lindemann CB, Kanous KS, 1989. Regulation of mammalian sperm motility. *Arch Androl* 23:1-22.
- Liu DY, Baker HWG, 1988. Calcium ionophore induced acrosome reaction correlates with fertilization rates in vitro in patients with teratozoospermic semen. *Human Reprod* 13:905-910.
- Liu DY, Clarke GN, Baker HW, 2006. Tyrosine phosphorylation on capacitated human sperm tail detected by immunofluorescence correlates strongly with sperm-zona pellucida (ZP) binding but not with the ZP-induced acrosome reaction. *Hum Reprod* 21:1002-1008.
- Llanos MN, Anabalon MC, 1996. Studies related to progesterone-induced hamster sperm acrosome reaction. *Mol Reprod Dev* 45:313-319.
- Llanos MN, Morales PJ, Anabalon Marconi, 1993. Characterization of the progesterone induced hamster sperm acrosome reaction. *Biol Reprod* 48 (Suppl 1):107(abstract 193).
- Loeser CR, Tulsani RP, 1999. The role of carbohydrates in the induction of the acrosome reaction in mouse spermatozoa. *Biol Reprod* 60:94-101.

- Long JA, Wildt DE, Wolfe BA, Critser JK, De Rossi RV, Howard JG, 1996. Sperm capacitation and acrosome reaction are compromised in teratospermic domestic cats. *Biol Reprod* 54:638-646.
- Louzan P, Gallardo MG, Tramezzani JH, 1986. Gamma-aminobutyric acid in the genital tract of the rat during the oestrous cycle. *J Reprod Fertil* 77:499-504.
- Luconi M, Bonaccorsi L, Krausz C, Gervasi G, Forti G, Baldi E, 1995. Stimulation of protein phosphorylation by platelet-activating factor and progesterone in human spermatozoa. *Mol Cell Endocrinol* 108:35-42.
- Luconi M, Krausz C, Forti G, Baldi E, 1996. Extracellular calcium negatively modulates tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity during capacitation of human spermatozoa. *Biol Reprod* 55:207-216.
- Luconi M, Krausz C, Barni T, Vannelli GB, Forti G, Baldi E, 1998a. Progesterone stimulates p42 extracellular signal-regulated kinase (p42erk) in human spermatozoa. *Mol Human Reprod* 4:251-258.
- Luconi M, Porazzi I, Ferruzzi P, Marchiani S, Forti G, Baldi E, 2005. Tyrosine phosphorylation of the a kinase anchoring protein 3 (AKAP3) and soluble adenylate cyclase are involved in the increase of human sperm motility by bicarbonate. *Biol Reprod* 72:22-32.
- Lukasiewicz PD, Eggers ED, Sagdullaev BT, McCall MA, 2004. GABAC receptor-mediated inhibition in the retina. *Vision Res* 44:3289-3296.
- Lyons HR, Land MB, Gibbs TT, Farb DH, 2001. Distinct signal transduction pathways for GABA-induced GABA(A) receptor down-regulation and uncoupling in neuronal culture: a role for voltage-gated calcium channels. *J Neurochem* 78:114-1126.
- Ma W, Pancrazio JJ, Andreadis JD, Shaffer KM, Stenger DA, Li BS, Zhang L, Baker JL, Maric D, 2001. Ethanol blocks cytosolic Ca<sup>2+</sup> responses triggered by activation of GABA(A) receptor/Cl<sup>-</sup> channels in cultured proliferating rat neuroepithelial cells. *Neuroscience* 104:913-922.
- MacDonald RL, Angelotti TP, 1993. Native and recombinant GABA(A) receptor channels. *Cell Physiol Biochem* 3:352-373.
- Macdonald RL, Barker JL, 1978. Benzodiazepines specifically modulate GABA-mediated postsynaptic inhibition in cultured mammalian neurones. *Nature* 271:563-564.
- Macdonald RL, Barker JL. 1979. Anticonvulsant and anesthetic barbiturates: different post-synaptic actions in cultured mammalian neurons. *Neurology* 29:432-447.

- Macdonald RL, Olsen RW, 1994. GABAA receptor channels. *Annu Rev Neurosc* 17:569-602.
- Macdonald RL, Twyman RE, 1992. Kinetic properties and regulation of GABAA receptor channels. En: *Ion Channels*. Narahashi T (ed), New York, Plenum :315-343.
- Mack SR, Zaneveld LJD, 1987. Acrosomal enzymes and ultrastructure of unfrozen and cryotreated human spermatozoa. *Gamete Res* 18:375-383.
- Mahesh VB, Brann DW, Hendry LB, 1996. Diverse modes of action of progesterone and its metabolites. *J Steroid Biochem Mol Biol* 56:209-219.
- Mahmoud AI, Parrish JJ, 1996. Oviduct fluid and heparin induce similar surface changes in bovine sperm during capacitation. *Mol Reprod Dev* 43:554-560.
- Maitra R, Reynolds JN, 1999. Subunit dependent modulation of GABAA receptor function by neuroactive steroids. *Brain Res* 819:75-82.
- Majewska MD, Vaupel DB, 1991. Steroid control of uterine motility via gamma-aminobutyric acidA receptors in the rabbit: a novel mechanism? *J Endocrinol* 131:427-434.
- Majewska MD, Harrison NL, Schwartz RD, Baker JL, Paul SM, 1986. Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science* 232:1004-1007.
- Majumder GC, Dey CS, Haldar S, Barua M, 1990. Biochemical parameters of initiation and regulation of sperm motility. *Arch Androl* 24:287-303.
- Makler A, 1978. A new multiple exposure photography method for objective human spermatozoa motility determination. *Fertil Steril* 30:192-199.
- Makler A, Blumenfeld Z, 1980. Optimum measurement time for human sperm velocity determination. *Arch Androl* 5:189-194.
- Malmgren L, 1997. Assessing the quality of raw semen. A review. *Theriogenology* 48:523-530.
- Marchesi VT, 1985. Stabilizing infrastructure of cell membranes. *Annu Rev Cell Biol*:531-561.
- Margalit I, Rubinstein S, Breitbart H, 1997. A novel method for evaluating the acrosomal status of mammalian spermatozoa. *Arch Androl* 39:87-99.
- Marin CI, Calamera JC, Rovasio RA, 1995. Development of an objective, semiautomated method for assessment of sperm motility. *Andrologia* 27:115-119.

- Marin-Briggiler CI, Vazquez-Levin MH, Gonzalez-Echeverria F, Blaquier JA, Miranda PV, Tezon JG, 2003. Effect of antisperm antibodies present in human follicular fluid upon the acrosome reaction and sperm-zona pellucida interaction. *Am J Reprod Immunol* 50:209-219.
- Marin-Briggiler CI, Gonzalez-Echeverria F, Buffone M, Calamera Julieta Corrá, Tezon JG, Vazquez-Levin MH, 2003. Calcium requirements for human sperm function in vitro. *Fertil Steril* 79:1396-1403.
- Marin-Briggiler CI, Jha KN, Chertihin O, Buffone MG, Herr JC, Vazquez-Levin MH, Visconti PE, 2005. Evidence of the presence of calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV in human sperm and its involvement in motility regulation. *J Cell Sci* 118(Pt 9):2013-2022.
- Marquez B, Suarez SS, 2004. Different signaling pathways in bovine sperm regulate capacitation and hyperactivation. *Biol Reprod* 70:1626-1633.
- Marti LI, Cebrian-Perez JA, Muino-Blanco T, 2000. Assessment of the acrosomal status of ram spermatozoa by RCA lectin-binding and partition in an aqueous two-phase system. *J Androl* 21:541-548.
- Martín del Río R, 1981.  $\gamma$ -aminobutyric acid system in rat ovary. *J Biol Chem* 256:9816-9819.
- Martín del Río R, López MS, 1983. Effects of aminooxyacetic acid on in vivo  $\gamma$ -aminobutyric acid system of rat oviduct. *Gen Pharmacol* 14:281-283.
- Martín del Río R, Orensanz LM, Fernandez I, 1986. The GABA System in the Ovary. En: *GABAergic Mechanisms in the Mammalian Periphery*. Erdö SL, Bowery NG (Ed), Raven Press, New York :241-247.
- Martinez P, Morros A, 1996. Membrane lipid dynamics during human sperm capacitation. *Front Biosci* 1:103-117.
- Martins SG, Miranda PV, Brandelli A, 2003. Acrosome reaction inhibitor released during in vitro sperm capacitation. *Int J Androl* 26:296-304.
- Marty A, Llano I, 2005. Excitatory effects of GABA in established brain networks. *Trends Neurosci* 28:284-289.
- Masotto C, Negro-Villar A, 1986. GABA and gonadotropin secretion: evidence from in vitro studies on regulation of LHRH secretion. En: *Racagni G, Doneso A (eds). GABA and Endocrine Function*. Raven Press, New York :243-250.



- Mate KE, Rodger JC, 1996. Capacitation and the acrosome reaction in Marsupial spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 8:595-603.
- Mattioli M, Barboni B, Lucidi P, Seren E, 1996. Identification of capacitation in boar spermatozoa by chlortetracycline assay. *Theriogenology* 45:373-381.
- Mattioli M, Lucidi P, Barboni B, 1998. Expanded cumuli induce acrosome reaction in boar sperm. *Mol Reprod Dev* 51:445-453.
- Maxwell WMC, Johnson LA, 1997. Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling, or cryopreservation. *Mol Reprod Dev* 46:408-418.
- Maxwell WCM, Robinson SJ, Roca J, Molinia FC, Sanchez-Partida LG, Evans G, 1995. Motility, acrosome integrity and fertility of frozen ram spermatozoa treated with caffeine, pentoxifylline, c-AMP, 2-deoxyadenosine and kallikrein. *Reprod Fertil Dev* 7:1081-1087.
- Maxwell WMC, Welch GR, Johnson LA, 1997. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod Fertil Dev* 8:1165-1178.
- Mayer ML, Westbrook GL, 1987. The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. *Prog Neurobiol* 28:197-276.
- McIntire SL, Jorgenson E, Kaplan J, Horvitz H, 1993. The GABAergic nervous system of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 364:337-341.
- McLaughlin EA, Ford WCL, Hull MGR, 1993. Effects of cryopreservation on the human sperm acrosome and its response to A23187. *J Reprod Fertil* 99:71-76.
- McNutt T, Killian GJ, 1989. Effect of bovine oviductal fluid (ODF) on sperm capacitation in vitro. *J Androl Suppl* 10:22P.
- McNutt TL, Killian GJ, 1991. Influence of bovine follicular and oviduct fluids on sperm capacitation in vitro. *J Androl* 12:244-252.
- Mehta AK, Ticku MK, 1999. An update on GABAA receptors. *Brain Res Rev* 29:196-217.
- Meizel S, 1985. Molecules that initiate or help stimulate the acrosome reaction by their interaction with mammalian sperm surface. *Am J Anat* 174:285-302.
- Meizel S, 1997. Amino acid neurotransmitter receptor/chloride channels of mammalian sperm and the acrosome reaction. *Biol Reprod* 56:569-574.

- Meizel S, 1998. The nongenomic effects of progesterone on sperm function. *Biol Reprod* 58 Suppl 1:30 (Abstract M-23).
- Meizel S, Son JH, 2005. Studies of sperm from mutant mice suggesting that two neurotransmitter receptors are important to the zona pellucida-initiated acrosome reaction. *Mol Reprod Dev* 72:250-258.
- Meizel S, Turner KO, 1991. Progesterone acts at the plasma membrane on human sperm. *Mol Cell Endocrinol* 11:R1-R5.
- Meizel S, Turner KO, 1996. Chloride efflux during the progesterone-initiated human sperm acrosome reaction is inhibited by lavendustin A, a tyrosine kinase inhibitor. *J Androl* 17:327-330.
- Meizel S, Pillai MC, Diaz-Perez E, Thomas P, 1990. Initiation of the human sperm acrosome reaction by components of human follicular fluid and cumulus secretions including steroids. En: Bavister BD, Cummins J, Roldan ERS (Eds). *Fertilization in Mammals*. Norwell, MA. Serono Symposia, USA :205-222.
- Melendrez CS, Meizel S, 1995. Studies of porcine and human sperm suggesting a role for a sperm glycine receptor/Cl<sup>-</sup> channel in the zona pellucida-initiated acrosome reaction. *Biol Reprod* 53:676-683.
- Melendrez CS, Meizel S, 1996. Immunochemical identification of the glycine receptor/Cl<sup>-</sup> channel in porcine sperm. *Biochem Biophys Res Comm* 223:675-678.
- Melendrez CS, Berger T, Meizel S, 1993. Progesterone initiation of the porcine acrosome reaction in vitro. *Biol Reprod* 48 (Suppl 1) Abstract 193:107.
- Melendrez CS, Meizel S, Berger T, 1994. Comparison of the ability of progesterone and heat solubilized porcine zona pellucida to initiate the porcine sperm acrosome reaction in vitro. *Mol Reprod Dev* 39:433-438.
- Mellon SH, 1994. Neurosteroids: Biochemistry, modes of action, and clinical relevance. *J Clin Endocrinol Metabol* 78:1003-1008.
- Mendoza C, Carreras A, Moss J, Tesarik J, 1992. Distinction between true acrosome reaction and degenerative acrosome loss by one-step staining method using *Pisum sativum* agglutinin. *J Reprod Fertil* 95:755-763.
- Mendoza C, Soler A, Tesarik J, 1995. Nongenomic steroid action-independent targeting of a plasma membrane calcium channel and a tyrosine kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 210:518-523.

- Meyers SA, Liu IKM, Overstreet JW, Drobnis EZ, 1993. Capacitation of stallion sperm in vitro assessed by progesterone-induced acrosome reaction. *Biol Reprod* 48 (suppl 1):107(abstract 194).
- Meyers SA, Overstreet JW, Liu IKM, Drobniz EZ, 1995. Capacitation in vitro of stallion spermatozoa: comparisons of progesterone-induced acrosome reactions in fertile and subfertile males. *J Androl* 16:47-54.
- Meyhofer W, 1965. Contribution to the cytophotometric evaluation of pathologically changed spermatozoa with special reference to round-shaped spermatozoa following Feulgen and fast green staining. *Z Haut Geschlechtskr* 39:174-182.
- Michelson HB, Wong RKS, 1991. Excitatory synaptic responses mediated by GABAA receptors in the hippocampus. *Science* 253:1420-1423.
- Mihic SJ, Sanna E, Whiting PJ, Haris RA, 1995. Pharmacology of recombinant GABAA receptors. En: Biggio G, Costa E (eds). *GABAA receptors and anxiety: from neurobiology to treatment*. New York. Raven Press :17-40.
- Minuk GY, Vergalla J, Ferenci P, Jones EA; 1984. Identification of an acceptor system for  $\gamma$ -aminobutyric acid on isolated rat hepatocytes. *Hepatology* 4:180-185.
- Misgeld U, Deisz RA, Dodt HU, Lux HD, 1986. The role of chloride transport in postsynaptic inhibition of hippocampal neurons. *Science* 232:1413-1415.
- Moller CC, Bleil JD, Kinloch RA, Wassarman PM, 1990. Structural and functional relationships between mouse and hamster zona pellucida glycoproteins. *Dev Biol* 137:276-286.
- Morales P, Llanos M, 1995. Role of the acrosome reaction in egg vestments and plasma membrane penetration En: Fénichel P, Parinaud J (eds). *Human Sperm Acrosome Reaction*. Colloque INSERM n° 236. John Libbey Eurotext Ltd, Paris, France :133-149.
- Morales P, Llanos M, Gutierrez G, Kohen P, Vigil P, Vantman D, 1992. The acrosome reaction-inducing activity of individual human follicular samples is highly variable and related to the steroid content. *Hum Reprod* 7:646-651.
- Mortimer D, Camenzind AR, 1989. The role of follicular fluid in inducing the acrosome reaction of human spermatozoa incubated in vitro. *Hum Reprod* 4:169-174.
- Mortimer D, Curtis EF, Miller RG, 1987. Specific labelling by peanut agglutinin of the outer acrosomal membrane of the human spermatozoon. *J Reprod Fertil* 81:127-135.

- Mortimer ST, 1997. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum Reprod Update* 3:403-439.
- Mousah H, Jacqmin P, Lesne M, 1987. The quantification of gamma-aminobutyric acid in the cerebrospinal fluid by a radioreceptor assay. *Clin Chim Acta* 170:151-159.
- Mudrak O, Tomilin N, Zalensky A, 2005. Chromosome architecture in the decondensing human sperm nucleus. *J Cell Sci* 118 (Pt 19):4541-450.
- Mueller C, Habenicht U, Drescher D, Schill WB, Koehn FM, 1998. Angiotensin II and the acrosome reaction. *J Androl Suppl Abstract* 47.
- Mukerji SK, Meizel S, 1975. The molecular transformation of rabbit testis proacrosin into acrosin. *Arch Biochem Biophys* 168:720-721.
- Müller-Esterl W, Fritz H, 1981. Sperm acrosin. En: Lorand L, ed. *Methods in Enzymology*, Vol 80. New York: Academic Press :621-632.
- Munire M, Shimizu Y, Sakata Y, Minaguchi R, Aso T, 2004. Impaired hyperactivation of human sperm in patients with infertility. *J Med Dent Sci* 51:99-104.
- Munuce MJ, Marin-Briggiler CI, Caille AM, Berta CL, Cuasnicu PS, Morisoli L, 2003. Modulation of human sperm function by peritoneal fluid. *Fertil Steril* 80:939-946.
- Murase T, Roldan ERS, 1996. Progesterone and the zona pellucida activate different transducing pathways in the sequence of events leading to diacylglycerol generation during mouse sperm acrosomal exocytosis. *Biochem J* 320:1017-1023.
- Murashima YL, Kato T, 1984. An improved enzymatic microassay method for glutamate decarboxylase. *Biomed Res* 5:527-532.
- Murashima YL, Kato T, 1986. Distribution of gamma-aminobutyric acid and glutamate decarboxylase in the layers of rat oviduct. *J Neurochem* 46:166-172.
- Myshunina TM, 2003. Gamma-aminobutyric acid in some non-neural tissues. *Fiziol Zh* 49:113-119.
- Naor Z, Breitbart H, 1997. Protein kinase C and mammalian spermatozoa acrosome reaction. *Trends Endocrinol Metab* 8:337-341.
- Napoleone P, Bronzetti E, Cavallotti C, Amenta F, 1990. Predominant epithelial localization of type A gamma-aminobutyric acid receptor sites within rat seminal vesicles and prostate glands. *Pharmacol* 41:49-56.
- Naz RK, 1996. Protein tyrosine phosphorylation and signal transduction during capacitation/acrosome reaction and zona pellucida binding in human sperm. *Arch Androl* 37:47-55.

- Naz RK, Rajesh PB, 2004. Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation / acrosome reaction. *Reprod Biol Endocrinol* 2:75.
- Naz RK, Ahmad K, Kumar R, 1991. Role of membrane tyrosine proteins in human spermatozoal functions. *J Cell Sci* 99:157-165.
- Naz RK, Ahmad K, Kaplan P, 1993. Involvement of cyclins and cdc2 serine/threonine protein kinase in human sperm cell function. *Biol Reprod* 48 :720-728.
- Neild DM, Gadella BM, Chaves MG, Miragaya MH, Colenbrander B, Agüero A, 2003. Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation. *Theriogenology* 59:1693-1705.
- Neill JM, Olds-Clarke P, 1987. A computer-assisted assay for mouse sperm hyperactivation demonstrates that bicarbonate but not bovine serum albumin is required. *Gamete Res* 18:121-140.
- Neri-Vidaurre P del C, Torres-Flores V, Gonzalez-Martinez MT, 2006. A remarkable increase in the pHi sensitivity of voltage-dependent calcium channels occurs in human sperm incubated in capacitating conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 343:105-109.
- Nestler EJ, Hyman SE, Malenka RC, 2001. *Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience*. New York, McGraw-Hill.
- New DC, An H, Ip NY, Wong YH, 2006. GABAB heterodimeric receptors promote Ca<sup>2+</sup> influx via store-operated channels in rat cortical neurons and transfected Chinese hamster ovary cells. *Neuroscience* 137:1347-1358.
- Nimmo MR, Cross NL, 2003. Structural features of sterols required to inhibit human sperm capacitation. *Biol Reprod* 68:1308-1317.
- Nixon B, Paul JW, Spiller CM, Attwell-Heap AG, Ashman LK, Aitken RJ, 2005. Evidence for the involvement of PECAM-1 in a receptor mediated signal-transduction pathway regulating capacitation-associated tyrosine phosphorylation in human spermatozoa. *J Cell Sci* 118(Pt 20):4865-4877.
- Nixon B, MacIntyre DA, Mitchell LA, Gibbs GM, O'Bryan M, Aitken RJ, 2006. The identification of mouse sperm-surface-associated proteins and characterization of their ability to act as decapacitation factors. *Biol Reprod* 74:275-287.
- Nolan JP, Hammerstedt RH, 1997. Regulation of membrane stability and the acrosome reaction in mammals sperm. *FASEB J* 11:670-682.

- Nour el-Din AA, Omar MA, Younes AA, Abboud MY, 1969. Application of eosin for differential staining of buffalo spermatozoa. IV. Use of opal blue-eosin. *J Reprod Fertil* 20:129-131.
- Odeh AI, Dascanio JJ, Caceci T, Bowen J, Eng LA, 2003. Effect of platelet-activating factor (PAF) on stallion sperm motility, capacitation and the acrosome reaction. *Reproduction* 126:605-613.
- Oehninger S, Sueldo C, Lanzendorf S, Mahony M, Burkman LJ, Alexander NJ, Hodgen GD, 1994. A sequential analysis of the effect of progesterone on specific sperm functions crucial to fertilization in vitro in infertile patients. *Hum Reprod* 9:1322-1327.
- Oettle EE, 1986. Using a new acrosome stain to evaluate sperm morphology. *Vet Med* : 263-266.
- Oettle EE, Soley J, 1986. Ultrastructural changes in the acrosome of human sperm during freezing and thawing. *Arch Androl* 17:145-150.
- O'Flaherty CM, Beorlegui NB, Beconi MT, 1999. Reactive oxygen requirements for bovine sperm capacitation and acrosome reaction. *Theriogenology* 52:289-301.
- O'Flaherty C, Beorlegui N, Beconi MT, 2003. Participation of superoxide anion in the capacitation of cryopreserved bovine sperm. *Int J Androl* 26:109-114.
- O'Flaherty C, Rodriguez P, Srivastava S, 2004a. L-arginine promotes capacitation and acrosome reaction in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biochim Biophys Acta* 1674:215-221.
- O'Flaherty C, de Lamirande E, Gagnon C, 2004b. Phosphorylation of the Arginine-X-X-(Serine/Threonine) motif in human sperm proteins during capacitation: modulation and protein kinase A dependency. *Mol Hum Reprod* 10:355-363.
- O'Flaherty C, de Lamirande E, Gagnon C, 2006. Reactive oxygen species modulate independent protein phosphorylation pathways during human sperm capacitation. *Free Radic Biol Med* 40:1045-1055.
- Okada A, Igarashi H, Kuroda M, Terao K, Yoshikawa Y, Sankai T, 2001. Cryopreservation-induced acrosomal vesiculation in live spermatozoa from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Hum Reprod* 16:2139-2147.
- Okada Y, Taniguchi H, Shimada C, 1976. High concentration of GABA and high glutamate decarboxylase activity in rat pancreatic islets and human insulinoma. *Science* 194:620-622.

- Okamura N, Tajima Y, Soejima A, Masuda H, 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.
- Okamura N, Tajima Y, Ishikawa H, Masuda H, Sugita Y, 1986. Lowered levels of bicarbonate in seminal plasma cause the poor sperm motility in human infertile patients. *Fertil Steril* 45:265-272.
- Okamura N, Tajima Y, Sugita Y, 1988. Decrease in bicarbonate transport activities during epididymal maturation of porcine sperm. *Biochem Biophys Res Commun* 157:1280-1287.
- Olds-Clarke P, Segó R, 1992. Calcium alters capacitation and progressive motility of uterine spermatozoa from +/+ and congenic TW32/+ mice. *Biol Reprod* 47:629-635.
- Olpe HR, Karlsson G, Pozza MF, Brugger F, Steinmann M, Van Riezen H, Fagg G, Hall RG, Froestl W, Bittiger H, 1990. CGP 35348: a centrally active blocker of GABA<sub>B</sub> receptors. *Eur J Pharmacol* 187:27-38.
- Olsen RW, 1981. GABA-benzodiazepine-barbiturate receptor interactions. *J Neurochem* 37:1-13.
- Olsen RW, 1987. The  $\gamma$ -aminobutyric acid/benzodiazepine/barbiturate receptor chloride ion channel complex of mammalian brain. En: *Synaptic Function*. Edelman GM, Galí WE, Cowan WM (eds). Neuroscience Research Foundation. Wiley :257-271.
- Olson GE, Noland TD, Winfrey VP, Garbers DL, 1983. Substructure of the postacrosomal sheath of bovine spermatozoa. *J Ultrastruct Res* 85:204-218.
- O'Rand, MG, 1979. Changes in sperm surface properties correlated with capacitation. En: Fawcett DW, Bedford JM (ed). *The Spermatozoon*. Baltimore: Urban & Schwarzenberg :195-204.
- Orensanz LM, Fernández I, Martín del Río R, 1983. On the origin and function of GABA in the rat fallopian tube. *Int J Fertil* 28:11-12.
- Orensanz LM, Fernández I, Martín del Río R, Storm-Mathisen J, 1986. Gamma-aminobutyric acid in the rat oviduct. *Adv Biochem Psychopharmacol* 42:265-274.
- Ortells MO, Lunt GG, 1995. Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors. *Trends Neurosci* 18:121-127.
- Oset-Gasque MJ, Castro E, Gonzalez MP, 1992. GABAergic mechanisms in bovine adrenal chromaffin cells: their role in the regulation of catecholamine secretion. En: *GABA outside the CNS*. Erdő S.L (Ed). Springer-Verlag, New York :167-181.

- Osheroff JE, Visconti PE, Valenzuela JP, Travis AJ, Alvarez J, Kopf GS, 1999. Regulation of human sperm capacitation by a cholesterol efflux-stimulated signal transduction pathway leading to protein kinase A-mediated up-regulation of protein tyrosine phosphorylation. *Mol Hum Reprod* 5:1017-1026.
- Osman RA, Andria ML, Jones AD, Meizel S, 1989. Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 160:828-833.
- Ozaki T, Takahashi K, Kanasaki H, Miyazaki K, 2002. Evaluation of acrosome reaction and viability of human sperm with two fluorescent dyes. *Arch Gynecol Obstet* 266:114-117.
- Pacey AA, Davies N, Warren MA, Barrat CL, Cooke ID, 1995. Hyperactivation may assist human spermatozoa to detach from intimate association with the endosalpinx. *Human Reprod* 10:2603-2609.
- Palecek J, Peknicova J, Vitu M, 1999. Changes in immunochemical localization of cytoskeletal proteins in human and boar spermatozoa before and after acrosome reaction. *Folia Biologica* 45:13-20.
- Pampiglione JS, Tan SL, Campbell S, 1993. The use of the stimulated acrosome reaction tests as a test of fertilizing ability in human spermatozoa. *Fertil Steril* 59:1280-1284.
- Pan ZH, 2001. Voltage-activated Ca<sup>2+</sup> channels and ionotropic GABA receptors localized at axon terminals of mammalian retinal bipolar cells. *Vis Neurosci* 18:279-288.
- Pan ZH, Zhang D, Zhang X, Lipston SA, 2000. Evidence for coassembly of mutant GABAC rho1 with GABAA gamma 2S, glycine alpha1 and glycine alpha2 receptor subunits in vitro. *Eur J Neurosci* 12:3137-3145.
- Parducz A, Joo F, Siklos L, Wolff JR, 1990. Fine structural changes in the superior cervical ganglion of adult rats after long-term administration of baclofen, a GABAB receptor agonist. *Neurosci* 36:239-245.
- Parinaud J, Milhet P, 1996. Progesterone induces a Ca<sup>++</sup>-dependent 3'-5'-cyclic adenosine monophosphate increase in human sperm. *J Clin Endocrinol Metab* 81:1357-1360.
- Park JC, Song DY, Lee JS, Kong ID, Jeong SW, Lee BH, Kang HS, Cho BP, 2006. Expression of GABA(A) receptor beta2/3 subunits in the rat major pelvic ganglion. *Neurosci Lett* 403:35-39



- Park JY, Ahn HJ, Gu JG, Lee KH, Kim JS, Kang HW, Lee JH, 2003. Molecular identification of Ca<sup>2+</sup> channels in human sperm. *Exp Mol Med* 35:285-292.
- Parkkila S, Kaunisto K, Kellokumpu S, Rajaniemi H, 1991. A high activity carbonic anhydrase isoenzyme (CA II) is present in mammalian spermatozoa. *Histochemistry* 95:477-482.
- Parks JE, Ehrenwald E, 1990. Cholesterol efflux from mammalian sperm and its potential role in capacitation. En: Gagnon C (ed) *Controls of Sperm Motility: Biological and Clinical Aspects*. Boca Raton, FL, USA :CRC Press :155-167.
- Parks JE, Graham JK, 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 38:209-222.
- Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA, First NL, 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod* 38:1171-1188.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Handrow RR, Sims MM, First NL, 1989. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. *Biol Reprod* 40:1020-1025.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Uguz C, First NL, 1994. Differences in the role of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate during capacitation of bovine sperm by heparin or oviduct fluid. *Biol Reprod* 51:1099-1108.
- Patel AB, de Graaf RA, Mason GF, Rothman DL, Shulman RG, Behar KL, 2005. The contribution of GABA to glutamate/glutamine cycling and energy metabolism in the rat cortex in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:5588-5593.
- Patel AB, de Graaf RA, Martin DL, Battaglioli G, Behar K, 2006. Evidence that GAD65 mediates increased GABA synthesis during intense neuronal activity in vivo. *J Neurochem* 97:385-396.
- Patrat C, Serres C, Jouannet P, 2000. The acrosome reaction. *Biol Cell* 92:255-266.
- Patrat C, Serres C, Jouannet P, 2002. Progesterone induces hyperpolarization after a transient depolarization phase in human spermatozoa. *Biol Reprod* 66:1775-1780.
- Paul SM, Purdy RH, 1992. Neuroactive steroids. *FASEB J* 6:2311-2322.
- Paulenz H, Grevle IS, Andersen Berg K, Thomassen R, 1995. The use of a dichromatic stain method (Spermac) for determining changes in the acrosomal integrity of boar semen during cryopreservation. *Reprod Dom Anim* 30:113-116.
- Pawson T, 1995. Protein modulates and signalling network. *Nature* 373:573-580.
- Pedersen H, Lebech PE, 1971. Ultrastructural changes in the human spermatozoa after freezing for artificial insemination. *Fertil Steril* 22:125-133.

- Pedersen RA, Burdsal CA, 1994. Mammalian embryogenesis. En: Physiology of Reproduction. Vol 1, Eds: Knobil E; Neill J, Raven Press, New York:319-390.
- Peknicova J, Moss J, 1998. Antibody against 28-kDa intra-acrosomal sperm protein as a tool for evaluation of acrosomal integrity in bull spermatozoa. *Folia Biologica (Praga)* 44:93-96.
- Pena A, Johannisson A, Linde-Forsberg C, 1999. Post-thaw evaluation of dog spermatozoa using new triple fluorescent staining and flow cytometry. *Theriogenology* 52:965-980.
- Pérez-Pé R, Grasa P, Fernandez-Juan M, Peleato ML, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T, 2002. Seminal plasma proteins reduce protein tyrosine phosphorylation in the plasma membrane of cold-shocked ram spermatozoa. *Mol reprod Dev* 61:226-233.
- Perrot-Sinal TS, Davis AM, Gregerson KA, Kao JP, McCarthy MM, 2001. Estradiol enhances excitatory gamma-aminobutyric acid-mediated calcium signaling in neonatal hypothalamic neurons. *Endocrinology* 142:2238-2243.
- Perry RL, Naneeni M, Barrat CLR, Warren MA, Cooke ID, 1995. A time course study of capacitation and the acrosome reaction in human spermatozoa using a revised chlortetracycline pattern classification. *Fertil Steril* 64:150-159.
- Perry RL, Barratt CL, Warren MA, Cooke ID, 1997. Elevating intracellular calcium levels in human sperm using an internal calcium ATPase inhibitor, 2,5-di(tert-butyl) hydroquinone (TBQ), initiates capacitation and the acrosome reaction but only in the presence of extracellular calcium. *J Exp Zool* 279:291-300.
- Persson H, Pelto-Huikko M, Metsis M, Soder O, Brene S, Skog S, Hokfelt T, Ritzen EM, 1990. Expression of the neurotransmitter-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase in male germ cells. *Mol Cell Biol* 10:4701-4711.
- Perez Pe R, Marti JI, Tejedor A, Muiño Blanco T, Cebrian Perez JA, 2002. Sperm-lectin agglutination combined with swim-up leads to an efficient selection of highly motile, viable and heterogeneous ram spermatozoa. *Theriogenology* 51:623-636.
- Peterson RN, Russell LD, Bundman D, Freund M, 1978. Presence of microfilaments and tubular structure in chemically induced acrosome reactions of boar spermatozoa. *Biol Reprod* 19:459-465.
- Petito JM, Mc Intyre TD, Mc Rae BL, Scolnick P, Arora PK, 1990. Differential immune responsiveness in mouse lines selectively bred for high and low sensitivity to ethanol. *Brain Behav Immun* 4:39-49.

- Pietrobon EO, Dominguez LA, Vicenti AE, Burgos MH, Fornes MW, 2001. Detection of the mouse acrosome reaction by acid phosphatase. Comparison with chlortetracycline and electron microscopy. *L Androl* 22:96-103.
- Pillai MC, Meizel S, 1991. Trypsin inhibitors prevent the progesterone-initiated increase in intracellular calcium required for the human sperm acrosome reaction. *J Exp Zool* 258:384-393.
- Pintado B, de la Fuente J, Roldan ER, 2000. Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoechst 33258, or to eosin: accuracy in the assessment of cell viability. *J Reprod Fertil* 118:145-152.
- Polakoski KL, Parrish RF, 1977. Boar proacrosin. Purification and preliminary activation studies of proacrosin isolated from ejaculated boar sperm. *J Biol Chem* 252:1888-1894.
- Pollard JW, Plante C, King WA, Hansen PJ, Betteridge KJ, Suarez SS, 1991. Fertilizing capacity of bovine sperm may be maintained by binding to oviductal epithelial cells. *Biol Reprod* 44:102-107.
- Pommer AC, Rutlant J, Meyers SA, 2003. Phosphorylation of protein tyrosine residues in fresh and cryopreserved stallion spermatozoa under capacitating conditions *Biol Reprod* 68:1208-1214.
- Primakoff P, Myles DG, 1983. A map of the guinea pig sperm surface constructed with monoclonal antibodies. *Dev Biol* 98:417-428.
- Pugh PA, Fukui Y, Tervit HR, Thompson JG, 1991. Developmental ability of in vitro matured sheep oocytes collected during the nonbreeding season and fertilized in vitro with frozen ram semen. *Theriogenology* 36:771-778.
- Puia G, Ducic I, Vicini S, Costa E, 1993. Does neurosteroid modulatory efficacy depend on GABAA receptor subunit composition? *Receptors and Channels* 1:135-142.
- Pukazhenthil BS, Wildt DE, Ottinger MA, Howard J, 1996a. Compromised sperm protein phosphorylation after swim-up and zona pellucida exposure in teratospermic domestic cats. *J Androl* 17:409-419.
- Pukazhenthil BS, Wildt DE, Ottinger MA, Howard JG, 1996b. Inhibition of domestic cat spermatozoa acrosome reaction and zona pellucida penetration by tyrosine kinase inhibitors. *Mol Reprod Dev* 48:48-57.

- Pukazhenthil BS, Long JA, Wildt DE, Ottinger MA, Armstrong DL, Howard J, 1998. Regulation of sperm function by protein tyrosine phosphorylation in diverse wild felid species. *J Androl* 19:675-685.
- Purohit SB, Laloraya M, Kumar GP, 1998. Bicarbonate-dependent lipid ordering and protein aggregation are part of the nongenomic action of progesterone on capacitated spermatozoa. *J Androl* 19:608-618.
- Purohit SB, Laloraya M, Kumar GP, 1999. Role of ions and ion channels in capacitation and acrosome reaction of spermatozoa. *Asian J Androl* 1:95-107.
- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Katz LC, LaMantia AS, McNamara JO, 1997. *Neuroscience*. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates, Inc.
- Qian H, Dowling JE, 1993. Novel GABA responses from rod-driven retinal horizontal cells. *Nature* 361:162-164.
- Quian H, Dowling JE, Ripps H, 1998. Molecular and pharmacological properties of GABA-rho subunits from white perch retina. *J Neurobiol* 37:305-320.
- Quill TA, Sugden SA, Rossi KL, Doolittle LK, Hammer RE, Garbers DL, 2003. Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:14869-14874.
- Rathi R, Colenbrander B, Bevers MM, Gadella BM, 2001. Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. *Biol Reprod* 65:462-470.
- Rathi R, Colenbrander B, Stout TA, Bevers MM, Gadella BM, 2003. Progesterone induces acrosome reaction in stallion spermatozoa via a protein tyrosine kinase dependent pathway. *Mol Reprod Dev* 64:120-128.
- Reyes R, Carranco A, Hernandez O, Rosado A, Merchant H, Delgado NM, 1984. Glycosaminoglycan sulfate as acrosomal reaction-inducing factor of follicular fluid. *Arch Androl* 12:203-209.
- Reyes R, Martinez JC, Delgado NM, Merchant-Larios H, 2002. Heparin-glutathione III: study with fluorescent probes as indicators of membrane status of bull sperm. *Arch Androl* 48:209-219.
- Rijsselaere T, Van Soom A, Maes D, de Kruif A, 2003. Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer. *Theriogenology* 60:1553-1568.
- Ritta MN, Calandra RS, 1986. Occurrence of GABA in rat testis and its effect on androgen production. *Adv Biochem Psychopharmacol* 42:291-297.

- Ritta MN, Campos MB, Calandra RS, 1987. Effect of GABA and benzodiazepines on testicular androgen production. *Life Sci* 40:791-797.
- Ritta MN, Campos MB, Calandra RS, 1991. Coexistence of gamma-aminobutyric acid type A and type B receptor in testicular interstitial cells. *J Neurochem* 56:1236-1240.
- Ritta MN, Calamera JC, Bas DE, 1998 Occurrence of GABA and GABA receptors in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 4:769-779.
- Ritta MN, Bas DE, Tartagliones CM, 2004. In vitro effect of gamma-aminobutyric acid on bovine spermatozoa capacitation. *Mol Reprod Dev* 67:478-486.
- Rivlin J, Mendel J, Rubinstein S, Etkovitz N, Breitbart H, 2004. Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol Reprod* 70:518-522.
- Robel P, Baulieu EE, 1994. Neurosteroids: Biosynthesis and function. *Meth Neurosci* 22:36-50.
- Roberts E, 1976. Introduction. En: *GABA in Nervous System Function*. Roberts E, Chase TN, Tower DV (Eds). Raven Press. New York :1-6.
- Roberts E, Frankel S, 1950.  $\gamma$ -aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid. *J Biol Chem* 187:55-63.
- Roberts E, Krause DN, 1982. Gamma-Aminobutyric acid system in cardiovascular and cerebrovascular function. *Isr J Med Sci* 18:75-81.
- Rochwerger L, Cuasnicu PS, 1992. Redistribution of a rat sperm epididymal glycoprotein after in vitro and in vivo capacitation. *Mol Reprod Dev* 31:34-41.
- Rodriguez PC, O'Flaherty CM, Beconi MT, Beorlegui NB, 2005. Nitric oxide-induced capacitation of cryopreserved bull spermatozoa and assessment of participating regulatory pathways. *Anim Reprod Sci* 85:231-242.
- Rojas FJ, Bruzzone ME, Moretti-Rojas I, 1992. Regulation of cyclic adenosine monophosphate synthesis in human ejaculated spermatozoa. II. The role of calcium and bicarbonate ions on the activation of adenylyl cyclase. *Hum Reprod* 7:1131-1135.
- Roldán ERS, Flemming AD, 1989. Is a  $Ca^{2+}$ -ATPase involved in  $Ca^{2+}$  regulation during capacitation and the acrosome reaction of guinea-pig spermatozoa?. *J Reprod Fertil* 85:297-308.
- Roldan ERS, Fragio C, 1993. Phospholipase A2 activity and exocytosis of the ram sperm acrosome: regulation by divalent cations. *Biochim Biophys Acta* 1168:108-114.

- Roldan ERS, Harrison RA, 1989. Polyphosphoinositide breakdown and subsequent exocytosis in the Ca<sup>2+</sup>/ionophore-induced acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Biochem J* 259:397-406.
- Roldan ERS, Vazquez JM, 1996. Bicarbonate/CO<sub>2</sub> induces rapid activation of phospholipase A<sub>2</sub> and renders boar spermatozoa capable of undergoing acrosomal exocytosis in response to progesterone. *FEBS Letters* 396:227-232.
- Roldán E, Murase T, Shi QX, 1994. Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida. *Science* 266:1578-1581.
- Rorsman P, Berggren PO, Bokvist K, Ericson H, Möhler H, Östenson CG, Smith PA, 1989. Glucose-inhibition of glucagon secretion involves activation of GABAA-receptor chloride channels. *Nature* 341:233-236.
- Rota A, Pena AI, Linde-Forsberg C, Rodriguez-Martinez H, 1999. In vitro capacitation of fresh, chilled and frozen-thawed dog spermatozoa assessed by the chlortetracycline assay and changes in motility patterns. *Anim Reprod Sci* 57:199-215.
- Rotem R, Zamir N, Keynan N, Barkan D, Breitbart H, Naor Z, 1998. Atrial natriuretic peptide induces acrosomal exocytosis of human spermatozoa. *Am J Physiol Endocrinol Metabolism* 37:E218-E223.
- Rozzo A, Armellin M, Franzot J, Chiaruttini C, Nistri A, Tongiorgi E, 2002. Expression and dendritic mRNA localization of GABAC receptor rho1 and rho2 subunits in developing rat brain and spinal cord. *Eur J Neurosci* 15:1747-1758.
- Rufo GA, Schoff PK, Lardy HA, 1984. Regulation of calcium content in bovine spermatozoa. *J Biol Chem* 259:2547-2552.
- Sabeur K, Meizel S, 1995. Importance of bicarbonate to the progesterone-initiated human sperm acrosome reaction. *J Androl* 16:266-271.
- Sabeur K, Edwards DP, Meizel S, 1996. Human sperm plasma membrane progesterone receptor(s) and the acrosome reaction. *Biol Reprod* 54:993-1001.
- Sakkas D, Leppens-Luisier G, Lucas H, Chardonens D, Campana A, Franken DR, Urner F, 2003. Localization of tyrosine phosphorylated proteins in human sperm and relation to capacitation and zona pellucida binding. *Biol Reprod* 68:1463-1469.
- Salamon S, Maxwell WMC, 1995. Frozen storage of ram semen. II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement (review). *Anim Reprod Sci* 38:1-36.

- Saling PM, Storey BT, 1979. Mouse gamete interaction during fertilization in vitro. Chlortetracycline as a fluorescent probe for the mouse sperm acrosome reaction. *J Cell Biol* 83:544-555.
- Salois D, Menard M, Paquette Y, Manjunath P, 1999. Complementary deoxyribonucleic acid cloning and tissue expression of BSP-A3 and BSP-30-kDa: Phosphatidylcholine and heparin-binding proteins of bovine seminal plasma. *Biol Reprod* 61:288-297.
- Saragüeta P, Lanuza G, Miranda PV, Tezón JG, Barañao JL, 1994. Immunoglobulins from human follicular fluid induce the acrosome reaction in human sperm. *Mol Reprod Dev* 39:280-288.
- Satin LS, Kinard TA, 1998. Neurotransmitter and their receptors in the islets of Langerhans of the pancreas. What messages do acetylcholine, glutamate, and GABA transmit? *Endocrine* 8:213-223.
- Scatton B, Benavides J, Dubois A, Bourdiol F, 1990. Proliferation of omega 3 binding sites in the immune organs and leg infiltrate of rats with adjuvant induced arthritis. *Int J Tissue React* 12:15-20.
- Schaeffer JM, Hsueh AJW, 1982. Identification of gamma-aminobutyric acid and its bindings sites in the rat ovary. *Life Sci* 30:1599-1604.
- Schatzmann HJ, 1982. The plasma membrane calcium pump of erythrocytes and other animal cells. En: *Membrane Transport of Calcium*. Carafoli E (Ed), Academic Press, London :41-108.
- Schembri MA, Major DA, Suttie JJ, Maxwell WM, Evans G, 2002. Capacitation-like changes in equine spermatozoa throughout the cryopreservation process. *Reprod Fertil Dev* 14:225-233.
- Schofield PR, Darlison MG, Fujita N, Burt DR, Stephenson FA, Rodriguez H, Rhee LM, Ramachandran J, Reale V, Glencorse TA, Seeburg PH, Barnard EA, 1987. Sequence and functional expression of the GABAA receptor shows a ligand-gated receptor superfamily. *Nature* 328:221-228.
- Schousbe A, Saito K, Wu JY, 1980. Characterization and cellular and subcellular localization of GABA-transaminase. *Brain Res Bull* 5 (Suppl. 2):71-76.
- Schuffner AA, Bastiaan HS, Duran HE, Lin ZY, Morshedi M, Franken DR, Oehninger S, 2002. Zona pellucida-induced acrosome reaction in human sperm: dependency on

activation of pertussis toxin-sensitive G(i) protein and extracellular calcium, and priming effect of progesterone and follicular fluid. *Mol Hum Reprod* 8:722-727.

-Schuster R, 1987. HPLC Analysis of amino acids in intravenous solutions. Hewlett Packard Application Note 12-5954-8916.

-Schuster R, 1988. Determination of amino acids in biological, pharmaceutical, plant and food samples by automated precolumn derivatization and high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 431:271-284.

-Scott T, Eagleson M, 1988. *Concise Encyclopedia of Biochemistry*. Second Edition. Walter de Gruyter & Co. Berlin :649.

-Sem'yanov AV, 2005. Diffusional extrasynaptic neurotransmission via glutamate and GABA. *Neurosci Behav Physiol* 35:253-266.

-Serres C, Feneux D, Jouannet P, David G, 1984. Influence of the flagellar wave development and propagation on the human sperm movement in seminal plasma. *Gamete Res* 9:183-195.

-Shaffer HE, Almquist JO, 1948. Vital staining of bovine spermatozoa with eosin-aniline blue staining mixture. *J Dairy Sci* 31:677.

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

-Shank RP, Aprison MH, 1971. Post-mortem changes in the content and specific radioactivity of several amino acids in four areas of the rat brain. *J Neurobiol* 2:145-151.

-Shannon P, 1978. Factors affecting semen preservation and conception rates in cattle. *J Reprod Fert* 54:519-527.

-Shi QX, Roldán ERS, 1995a. Evidence that a GABAA-like receptor is involved in progesterone-induced acrosomal exocytosis in mouse spermatozoa. *Biol Reprod* 52:373-381.

-Shi QX, Roldan ES, 1995b. Bicarbonate/CO<sub>2</sub> is not required for zona pellucida- or progesterone-induced acrosomal exocytosis of mouse spermatozoa but is essential for capacitation. *Biol Reprod* 52:540-546.

-Shi QX, Yuan YY, Jia ZY, Roldan ERS, 1996. GABA initiation of the acrosome reaction in mammalian sperm and interaction with progesterone. *Biol Reprod* 54 (Suppl. 1):60.



- Shi QX, Yuan YY, Roldan ER, 1997.  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) induces the acrosome reaction in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 3:677-683.
- Shi QX, Chen WY, Yuan YY, Mao LZ, Yu SQ, Chen AJ, Ni Y, Roldan ER, 2005. Progesterone primes zona pellucida-induced activation of phospholipase A2 during acrosomal exocytosis in guinea pig spermatozoa. *J Cell Physiol* 205:344-354.
- Shit S, Atreja SK, 2004. Phospholipase A2 activation by hydrogen peroxide during in vitro capacitation of buffalo spermatozoa. *Indian J Exp Biol* 42:486-490.
- Si Y, Olds-Clarke P, 2000. Evidence for the involvement of calmodulin in mouse sperm capacitation. *Biol Reprod* 62:1231-1239.
- Sidhu KS, Mate KE, Gunasekera T, Veal D, Hetherington L, Baker MA, Aitken RJ, Rodger JC, 2004. A flow cytometric assay for global estimation of tyrosine phosphorylation associated with capacitation of spermatozoa from two marsupial species, the tammar wallaby (*Macropus eugenii*) and the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). *Reproduction* 127:95-103.
- Sigel E, Stephenson FA, Mamalaki C, Barnard, 1983. A  $\gamma$ -aminobutyric acid/benzodiazepine receptor complex of bovine cerebral cortex: Purification and partial characterization. *J Biol Chem* 258:6965-6971.
- Siiteri JE, Gottlieb W, Meizel S, 1988. Partial characterization of a fraction from human follicular fluid that initiates the human sperm acrosome reaction in vitro. *Gamete Res* 20:25-42.
- Silviotti L, Nistri A, 1991. GABA receptor mechanisms in the central nervous system. *Prog Neurobiol* 36:35-92.
- Sonnewald U, Kortner TM, Qu H, Olstad E, Sunol C, Bak LK, Schousboe A, Waagepetersen HS, 2006. Demonstration of extensive GABA synthesis in the small population of GAD positive neurons in cerebellar cultures by the use of pharmacological tools. *Neurochem Int* 48:572-578.
- Smith AJ, Alder L, Silk J, Adkins C, Fletcher AE, Scales T, Kerby J, Marshall G, Wafford KA, McKernan RM, Atack JR, 2001. Effect of alpha subunit on allosteric modulation of ion channel function in stably expressed human recombinant gamma-aminobutyric acid(A) receptors determined using  $(36)\text{Cl}$  ion flux. *Mol Pharmacol* 59:1108-1118.
- Smith RL, Clayton CL, Wilcox CL, Escudera KW, Staley WJ, 1995. Differential expression of an inwardly rectifying chloride conductance in rat brain neuronal potential

mechanism for cell-specific modulation of post-synaptic inhibition. *J Neurosci* 15:4057-4067.

-Smith TT, 1998. The modulation of sperm function by the oviductal epithelium. *Biol Reprod* 58:1102-1104.

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

-Smith TT, Yanagimachi R, 1991. Attachment and release of spermatozoa from the caudal isthmus of the hamster oviduct. *J Reprod Fertil* 91:567-573.

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

-Snyder SH, 1984. Drug and neurotransmitter receptor in the brain. *Science* 224:22-31.

-Sokoloski JE, Blasco L, Storey BT, Wolf DP, 1977. Turbidimetric analysis of human sperm motility. *Fertil Steril* 28:1337-1341.

-Somanath PR, Gandhi KK, 2002. Expression of membrane associated non-genomic progesterone receptor(s) in caprine spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 74:195-205.

-Somanath PR, Suraj K, Gandhi KK, 2000. Caprine sperm acrosome reaction: promotion by progesterone and homologous zona pellucida. *Small Rumin Res* 37:279-286.

-Somogyi P, Hodgson AJ, Chubb IW, Penke B, Erdei A, 1985. Antiserum to  $\gamma$ -aminobutyric acid: II. Immunocytochemical application to the central nervous system. *J Histochem Cytochem* 33:241-248.

-Sorenson RL, Garry DG, Brelje TC, 1991. Structural and functional considerations of GABA in islets of Langerhans. *Diabetes* 40:1365-1374.

-Staley KJ, 1994. The role of an inwardly rectifying chloride conductance in postsynaptic inhibition. *J Neurophysiol* 72:273-284.

-Stambaugh R, Brackett BG, Mastroianni L, 1969. Inhibition of in vitro fertilization of rabbit ova by trypsin inhibitors. *Biol Reprod* 1:223-227.

-Stauss CR, Votta T.J, Suarez SS, 1995. Sperm motility hyperactivation facilitates penetration of the hamster zona pellucida. *Biol Reprod* 53:1280-1285.

-Steel RGD, Torrie JH, 1981. Principles and Procedures of Statistics A Biomedical Approach. Mc Graw-Hill, NY.

- Study RE, Baker JL, 1981. Diazepam and (+/-) pentobarbital: Fluctuation analysis reveals different mechanisms for potentiation of  $\gamma$ -aminobutyric acid responses in cultured central neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:7180-7184.
- Suarez SS, 1987. Sperm transport and motility in the mouse oviduct-observations in situ. *Biol Reprod* 36:203-210.
- Suarez SS, 1996. Hyperactivated motility in sperm. *J Androl* 17:331-335.
- Suarez SS, 1998. The oviductal sperm reservoir in mammals: mechanisms of formation. *Biol Reprod* 58:1105-1107.
- Suarez SS, Ho HC, 2003. Hyperactivated motility in sperm. *Reprod Domest Anim* 38:119-124.
- Suarez SS, Katz DF, Overstreet W, 1983. Movement characteristics and acrosomal status of rabbit spermatozoa recovered at the site and time of fertilization. *Biol Reprod* 29:1127-1187.
- Suarez SS, Katz DF, Owen DH, Andrew JB, Powell RL, 1991. Evidence for function of hyperactivated motility in sperm. *Biol Reprod* 44:375-381.
- Suarez SS, Dai X, Demott RP, 1992. Movement characteristics of boar sperm obtained from the oviduct or hyperactivated in vitro. *J Androl* 13:75-80.
- Sueldo CE, Oehninger S, Subias E, Mahony E, Alexander NJ, Burkman LJ, Acosta AA, 1993. Effect of progesterone on human zona pellucida sperm binding and oocyte penetrating capacity. *Fertil Steril* 60:137-140.
- Suzuki F, Yanagimachi R, 1989. Changes in the distribution of intramembranous particles and Filipin-reactive membrane sterols during in vitro capacitation of golden hamster spermatozoa. *Gamete Res* 23:335-347.
- Suzuki K, Geshi M, Yamauchi N, Nagai T, 2003. Functional changes and motility characteristics of Japanese Black bull spermatozoa separated by Percoll. *Anim Reprod Sci* 77:157-172.
- Suzuki Y, Okada T, Shibuya M, Kageyama N, Asano M, Hidaka H, 1984. Gamma-aminobutyric acid induced contraction of the dog basilar artery. *Pharmacology* 29:24-30.
- Talbot P, Chacon RS, 1980. A new procedure for rapidly scoring acrosome reactions of human sperm. *Gamete Res* 3:211-216.
- Talbot P, Chacon R, 1981. A triple stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. *J Exp Zool* 215:201-208.

- Talbot P, Chacon R, 1982. Ultrastructural observations on binding and membrane fusion between human sperm and zona pellucida-free hamster oocytes. *Fertil Steril* 37:240-248.
- Talbot P, Kleve MG, 1978. Hamster sperm cross-react with antiactin. *J Exp Zool* 204:131-136.
- Tamblyn TM, 1980. Identification of actin in boar epididymal spermatozoa. *Biol Reprod* 22:727-734.
- Tamuli MK, Watson PF, 1994. Use of a simple staining technique to distinguish acrosomal changes in the live sperm sub-population. *Anim Reprod Sci* 35:247-254.
- Tanaka C, 1985.  $\gamma$ -Aminobutyric acid in peripheral tissues. *Life Sci* 37:2221-2235.
- Tanaka C, Taniyama, 1992. The role of GABA in the peripheral nervous system. En: *GABA Outside the CNS*. Erdö SL (Ed). Springer-Verlag, New York :3-17.
- Taniguchi H, Okada Y, Seguchi C, Seki M, Tsutou A y Baba S, 1979. High concentration of gamma-aminobutyric acid in pancreatic beta cell. *Diabetes* 28:629-633.
- Taniguchi H, Murakami K, Yoshioka M, Ejiri K, Ishihara K, Baba S, Okada Y, 1982. GABA and insulin in pancreatic islets. En: *Problems in GABA research from brain to bacteria*. Okada Y, Roberts E (Eds). Excerpta Med, Amsterdam, The Netherlands : 406-412.
- Tao J, Du J, Critser ES, Critser JK, 1993. Assessment of the acrosomal status and viability of human spermatozoa simultaneously using flow cytometry. *Human Reprod* 8:1879-1885.
- Tardif S, Dube C, Bailey JL, 2003. Porcine sperm capacitation and tyrosine kinase activity are dependent on bicarbonate and calcium but protein tyrosine phosphorylation is only associated with calcium. *Biol Reprod* 68:207-213.
- Tardif S, Lefievre L, Gagnon C, Bailey JL, 2004. Implication of cAMP during porcine sperm capacitation and protein tyrosine phosphorylation. *Mol Reprod Dev* 69:428-435.
- Tasdemir M, Tasdemir I, Kodama H, Tanaka T, 1993. Pentoxifylline-enhanced acrosome reaction correlates with fertilization in vitro. *Hum Reprod* 8:2102-2107.
- Tervit HR, Whittingham DG, Rowson LEA, 1972. Successful culture of sheep and cattle ova. *J Reprod Fertil* 30:493-497.
- Tesarik J, Mendoza C, 1995. Sperm treatment with pentoxifylline improves the fertilizing ability in patients with acrosome reaction insufficiency. *Fert Steril* 60:141-148.

- Tesarik J, Mendoza C, Carreras A, 1993a. Fast acrosome reaction measure: a highly sensitive method for evaluating stimulus-induced acrosome reaction. *Fertil Steril* 59:424-430.
- Tesarik J, Moos J, Mendoza C, 1993b. Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by a progesterone receptor on the cell surface of human sperm. *Endocrinology* 133:328-335.
- Tesarik J, Carrera A, Mendoza C, 1996. Single cell analysis of tyrosine kinase dependent and independent Ca<sup>2+</sup> fluxes in progesterone induced acrosome reaction. *Mol Hum Reprod* 2:225-232.
- Therien I, Manjunath P, 2003. Effect of progesterone on bovine sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol Reprod* 69:1408-1415.
- Thérien I, Bleau G, Manjunath P, 1995. Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. *Biol Reprod* 52:1372-1379.
- Thérien I, Soubeyrand S, Manjunath P, 1997. Major proteins of bovine seminal plasma modulate sperm capacitation by high-density lipoprotein. *Biol Reprod* 57:1080-1088.
- Thérien I, Moreau R, Manjunath P, 1998. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. *Biol Reprod* 59:768-776.
- Thérien I, Moreau R, Manjunath P, 1999. Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. *Biol Reprod* 61:590-598.
- Thomas P, Meizel S, 1989. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis in human sperm stimulated with follicular fluid or progesterone is dependent upon Ca<sup>2+</sup> influx. *Biochem J* 264:539-546.
- Thompson JGE, Cummins JM, 1985. The effects of washing and protein supplementation on the acrosome reaction of ram spermatozoa in vitro. *Anim Reprod Sci* 9:75-86.
- Thundathil J, de Lamirande E, Gagnon C, 2003. Nitric oxide regulates the phosphorylation of the threonine-glutamine-tyrosine motif in proteins of human spermatozoa during capacitation. *Biol Reprod* 68:1291-1298.
- Thundathil JC, Anzar M, Buhr MM, 2006. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase as a Signaling Molecule During Bovine Sperm Capacitation. *Biol Reprod* 2006 May 10; [Epub ahead

- Thurston LM, Watson PF, Mileham AJ, Holt WV, 2001. Morphologically distinct sperm subpopulations defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. *J Androl* 22:382-394.
- Tillakaratne NJK, Erlander MG, Collard MW, Greif KF, Tobin AJ, 1992. Glutamate decarboxylases in nonneuronal cells of rat testis and oviduct: Differential expression of GAD 65 and GAD 67. *J Neurochem* 58:618-627.
- Tillakaratne NJK, Medina-Kauwe L, Gibson KM, 1995. Gamma-aminobutyric acid (GABA) metabolism in mammalian neural and nonneural tissues. *Comp Biochem Physiol* 112A:247-263.
- Tobias PS, Schumacher GFB, 1977. Observation of two proacrosins in extracts of human spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun* 74:434-439.
- Tollner TL, Van de Voort CA, Overstreet JW, Drobnis EZ; 1990. Cryopreservation of spermatozoa from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J Reprod Fertil* 90:347-352.
- Tollner TL, Yudin AI, Treece CA, Overstreet JW, Cherr GN, 2004. Macaque sperm release ESP13.2 and PSP94 during capacitation: the absence of ESP13.2 is linked to sperm-zona recognition and binding. *Mol Reprod Dev* 69:325-337.
- Tomes CN, Mc Master CR, Sailing PM, 1996. Activation of mouse PIP2-PLC by zona pellucida is modulated by tyrosine phosphorylation. *Mol Reprod Dev* 43:196-204.
- Tomes CN, Carballada R, Moses DF, Katz DF, Sailing PM, 1998. Treatment of human spermatozoa with seminal plasma inhibits protein tyrosine phosphorylation. *Mol Hum Reprod* 4:17-25.
- Tomiya T, Ohashi Kenny, Tsutsui T, Saji F, Tanizawa O, 1995. Acrosome reaction induced in a limited population of human spermatozoa by progesterone (Ca (2+)-dependent) and ATP (Ca (2+)-independent). *Hum Reprod* 10:2052-2055.
- Topfer-Petersen E, Cechova D, Henschen A, Steinberger M, Friess AE, Zucker A, 1990. Cell biology of acrosomal proteins. *Andrologia* 22 Suppl 1:110-121.
- Topper EK, Killian GJ, Way A, Engel B, Woelders H, 1999. Influence of capacitation and fluids from the male and female genital tract on the zona binding ability of bull spermatozoa. *J Reprod Fertil* 115:175-183.
- Toshimori K, 1998. Maturation of mammalian spermatozoa: modifications of the acrosome and plasma membrane leading to fertilization. *Cell Tissue Res* 293:177-187.

- Towbin H, Staehelin TH, Gordon J, 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4359-4364.
- Toyoda Y, Yokohama M, Hoshi T, 1971. Studies on the fertilization of mouse eggs in vitro. *Jpn J Anim Reprod* 16:147-157.
- Travis AJ, Kopf GS, 2002. The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. *J Clin Invest* 110:731-736.
- Tsai LH, 2005. Function of GABAergic and glutamatergic neurons in the stomach. *J Biomed Sci* 12:255-266.
- Tsuji M, Nakajima T, 1978. Studies on the formation of gamma-aminobutyric acid from putrescine in rat organs and purification of its synthetic enzyme from rat intestine. *J Biochem* 83:1407-1412.
- Tulsani DRP, Abou-Haila A, Loeser CR, Pereira BJM, 1998. The biological and functional significance of the sperm acrosome and acrosomal enzymes in mammalian fertilization. *Exp Cell Res* 240:151-164.
- Turner KO, Meizel S, 1995. Progesterone-mediated efflux of cytosolic chloride during the human sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Comm* 213:774-780.
- Turner K, Garcia MA, Meizel S, 1994. Progesterone initiation of the human sperm acrosome reaction: the obligatory increase in intracellular calcium is independent of the chloride requirement. *Mol Cell Endocrinol* 101:221-225.
- Twyman RE, Rogers CJ, Macdonald RL, 1989. Differential mechanisms for enhancement of GABA by diazepam and phenobarbital: a single channel study. *Ann Neurol* 25:213-220.
- Vacher CM, Bettler B, 2003. GABA(B) receptors as potential therapeutic targets. *Curr Drug Target CNS Neurol Disord* 2:248-259.
- Van Demark NL, Estergreen VL Jr, Schorr R, Kuhlman DE, 1959. Use of fluorescent dyes for observing bovine spermatozoa in opaque media. *J Dairy Sci* 42:1314-1319.
- Vandevoort CA, Overstreet JW, 1995. Effects of glucose and other energy substrates on the hyperactivated motility of macaque sperm and the zona-pellucida-induced acrosome reaction. *J Androl* 16:327-333.
- Varner DD, Ward CR, Storey BT, Kenney RM, 1987. Induction and characterization of acrosome reaction in equine spermatozoa. *Am J Vet Res* 48:1383-1389.

- Vasquez JM, Magargee SF, Kunze E, Hammerstedt RH, 1990. Lectins and heparin-binding features of human spermatozoa as analyzed by flow cytometry. *Am J Obstet Gynecol* 163 (Pt 1):2006-2012.
- Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K, 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practise. *Theriogenology* 57:149-179.
- Viggiano JM, Herrero MB, Perez Martinez S, De Gimeno MF, 1996. Analysis of the effect of nitric oxide synthase inhibition on mouse sperm employing a modified staining method for assessment of the acrosome reaction. *J Androl* 17:692-698.
- Vijayan E, McCann SM, 1978. The effects of intraventricular injection of GABA on prolactin and gonadotropin release in conscious female rats. *Brain Res* 155:35-43.
- Villegas J, Kehr K, Soto L, Henkel R, Miska W, Sanchez R, 2003. Reactive oxygen species induce reversible capacitation in human spermatozoa. *Andrologia* 35:227-232.
- Vincent SR; Hokfelt T, Wu J-Y, Elde RP, Morgan LM y Kimmel JR; 1983. Immunohistochemical studies of the GABA system in the pancreas. *Neuroendocrinology* 36:197-204.
- Virmani M, Stojilbovic S, 1989. Activation of GABAA receptors stimulates LH release from cultured rat pituitary cells. 71st Ann Meet Endocrin Soc, New Orleans LA, Abstract 959:262.
- Virtanen I, Badley RA, Paasivuo R, Letho VP, 1984. Distinct cytoskeletal domains revealed in sperm cells. *J Cell Biol* 99:1083-1091.
- Visconti PE, Kopf GS, 1998. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol Reprod* 59:1-6.
- Visconti PE, Muschietti JP, Flawia MM, Tezón JG, 1990. Bicarbonate dependence of cAMP accumulation induced by phorbol esters in hamster spermatozoa. *Biochim Biophys Acta* 1054:231-236.
- Visconti PE, Moore GD, Balley JL, Leclerc P, Connors SA, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS, 1995a. Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by cAMP-dependent way. *Development* 121:1139-1150.
- Visconti PE, Balley JL, Moore GD, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS, 1995b. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* 121:1129-1137.



- Visconti PE, Johnson L, Oyaski M, Fornés M, Moss SB, Gerton GL, Kopf GS, 1997. Regulation, localization, and anchoring of protein kinase a subunits during mouse sperm capacitation. *Dev Biol* 192:351-363.
- Visconti PE, Galantino-Homer H, Moore GD, Bailey JL, Ning X, Fornes M, Kopf GS, 1998. The molecular basis of sperm capacitation. *J Androl* 19:242-248.
- Visconti PE, Ning X, Fornes MW, Alvarez JG, Stein P, Connors SA, Kopf GS, 1999. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Dev Biol* 214:429-443.
- Visser JWM, 1981. Vital staining of hemopoietic cells with the fluorescent bisbenzimidazole derivatives Hoechst 33342 and 33258. *Acta Pathol Microbiol Scand (Suppl)* 274:86-90.
- Wang WH, Abeydeera LR, Fraser LR, Niwa K, 1995. Functional analysis using chlortetracycline fluorescence and in vitro fertilization of frozen-thawed ejaculated boar spermatozoa incubated in a protein-free chemically defined medium. *J Reprod Fertil* 104:305-313.
- Ward CR, Storey BT, 1984. Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescent assay. *Dev Biol* 104:287-296.
- Ward WS, Coffey DS, 1991. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: Comparison with somatic cells. *Biol Reprod* 44:569-574.
- Warnke C, Tuchscherer A, Alm H, Kanitz W, Blottner S, Torner H, 2003. Characterisation of movement pattern and velocities of stallion spermatozoa depending on donor, season and cryopreservation. *Acta Vet Hung* 51:395-408.
- Wassarman PM, 1991. Cellular and molecular elements of mammalian fertilization. En: Dale B (Ed). *Mechanisms of Fertilization*. Berlin. Springer-Verlag :305-314.
- Watanabe M, Maemura K, Kanbara K, Tamayama T, Hayasaki H, 2002. GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. *Int Rev Cytol* 213:1-47.
- Watson PF, Martin ICA, 1972. A comparison of changes in the acrosomes of deep-frozen ram and bull spermatozoa. *J Reprod Fert* 28:99-101.
- Watson PF, 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.

- Watson PF, Jones PS, Plummer JM, 1991. A quantitative comparison of the spontaneous and ionophore-induced acrosome reaction in ejaculated ram spermatozoa: the effects of temperature, time and individual. *Anim Reprod Sci* 24:93-108.
- Way AL, Henault MA, Killian GJ, 1995. Comparison of four methods for evaluating acrosome status and viability of ejaculated and cauda epididymal bull spermatozoa. *Theriogenology* 43:1301-1316.
- Weinman S, Ores-Carton C, Escaig F, Feinberg J, Puszkin S, 1986. Calmodulin immunoelectron microscopy: redistribution during ram spermatogenesis and epididymal maturation. II. *J Histochem Cytochem* 34:1181-1193.
- Welch JE, O'Rand MG, 1985. Identification and distribution of actin in spermatogenic cells and spermatozoa of the rabbit. *Dev Biol* 109:411-417.
- Wells ME, Awa DA, 1970. New technique for assessing acrosomal characteristics of spermatozoa. *J Dairy Sci* 53:227-232.
- Wetzels AM, Janssen HJ, Goverde HJ, Bastiaans BA, Takahashi K, Rolland R, 1993. The influence of sperm density on the motility characteristics of washed human spermatozoa. *Int J Androl* 16:15-19.
- White HL, Sato TL, 1978. GABA-transaminase of human brain and peripheral tissues-kinetic and molecular properties. *J Neurochem* 31:41-47.
- Williams RM, Graham JK, Hammersted RH, 1991. Determination of the capacity of ram epididymal and ejaculated sperm to undergo the acrosome reaction and penetrate ova. *Biol Reprod* 44:1080-1091.
- Wisden W, Korpi ER, Bahn S, 1996. The cerebellum: a model system for studying GABAA receptor diversity. *Neuropharmacology* 35:1139-1160.
- Wistrom CA, Meizel S, 1993. Involvement of a human sperm putative GABAA receptor/Cl<sup>-</sup> channel complex in the progesterone-initiated acrosome reaction. *Dev Biol* 159:679-690.
- Woelders H, Matthijs A, Theunissen M, Boon C, de Vries A, 1992. Fluorometric evaluation of sperm concentration and percentage membrane-intact sperm using Hoechst 33258 and DAPI. *Proc 12th Int Cong Anim Reprod* 2:1611-1613.
- Wolf DE, Lipscomb AC, Maynard VM, 1988. Causes of nondiffusing lipid in the plasma membrane of mammalian spermatozoa. *Biochemistry* 27:860-865.
- Wolf DP, Bolt J, Byrd W, Bechtol K, 1985. Acrosomal status evaluation in human ejaculated sperm with monoclonal antibodies. *Biol Reprod* 32:1157-1162.

- Wolf DP, Vande Voort CA, Meyer-Haas GR, 1989. In vitro fertilization and embryo transfer in the rhesus monkey. *Biol Reprod* 41:335-346.
- Wolff JR, Joo F, Dames W, 1978. Plasticity in dendrites shown by continuous GABA administration in superior cervical ganglion of adult rat. *Nature* 274:72-74.
- Wolff JR, Joo F, Kasa P, 1987. Synaptic, metabolic and morphogenetic effects of GABA in the superior cervical ganglion of rats. En: *Neurotrophic activity of GABA during development*. Redburn DA, Schousboe A (Eds). Alan R Liss, New York :221-252.
- Wolff JR, Kasa P, Dobo E, Parducz A, Joo F, 1992. The GABAergic innervation of paravertebral sympathetic ganglia. En: *GABA Outside the CNS*. Erdö SL (Ed). Springer-Verlag, New York :45-63.
- Woolley DM, Richardson DW, 1978. Ultrastructural injury to human spermatozoa after freezing and thawing. *J Reprod Fertil* 53:389-394.
- Wu JY, 1976. Purification, characterization and kinetic studies of GAD and GABA-T from mouse brain. En: *GABA in Nervous System Function*. Roberts E, Chase TN, Tower DT (eds). Raven Press, New York :7-55.
- Wu JT, Chiang KC, Cheng FP, 2006. Expression of progesterone receptor(s) during capacitation and incidence of acrosome reaction induced by progesterone and zona proteins in boar spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 93:34-45.
- Xie X, Smart TG, 1991. A physiological role for endogenous zinc in rat hippocampal synaptic neurotransmission. *Nature* 349:521-524.
- Xie X, Smart TG, 1993. Properties of GABA-mediated synaptic potentials induced by zinc in adult rat hippocampal neurons. *J Physiol* 460:503-523.
- Yagi A, Paranko J, 1995. Actin, alpha-actinin, and spectrin with specific associations with the postacrosomal and acrosomal domains of bovine spermatozoa. *Anat Rec* 241:77-87.
- Yanagimachi R, 1969. In vitro acrosome reaction and capacitation of golden hamster spermatozoa by bovine follicular fluid and its fractions. *J Exp Zool* 170:269-280.
- Yanagimachi R, 1970. The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. *J Reprod Fertil* 23:193-196.
- Yanagimachi R, 1982. Requirement of extracellular calcium ions for various stages of fertilization related phenomena in the hamster. *Gamete Res* 5:323-344.

- Yanagimachi R, 1994. Mammalian fertilization. En: Physiology of Reproduction. Vol 1; Eds: Knobil E, Neill J. Raven Press, New York:189-317.
- Yanagimachi R, Noda YD, 1970. Ultrastructural changes in the hamster sperm head during fertilization. *J Ultrastruc Res* 31:465-485.
- Yanagimachi R, Suzuki F, 1985. A further study of lysolecithin-mediated acrosome reaction of guinea pig spermatozoa. *Gamete Res* 11:29-40.
- Yang JS, Olsen RW, 1987.  $\gamma$ -Aminobutyric acid receptor binding in fresh mouse brain membranes at 22°C: ligand-induced changes in affinity. *Mol Pharmacol* 32:266-277.
- Yao Y, Ho P, Yeung WS, 1999. Effects of human oviductal cell coculture on various functional parameters of human spermatozoa. *Fertil Steril* 71:232-239.
- Yogeeswari P, Sriram D, Vaigundaragavendran J, 2005. The GABA shunt: an attractive and potential therapeutic target in the treatment of epileptic disorders. *Curr Drug Metab* 6:127-139.
- Yoon KW, 1994. Voltage-dependent modulation of GABAA receptor channels in rat hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 71:2151-2160.
- Young RJ, Bodt BA, 1994. Development of computer-directed methods for the identification of hyperactivated motion using motion patterns developed by rabbit sperm during incubation under capacitation conditions. *J Androl* 15:362-377.
- Youssef HM, Doncel GF, Bassiouni BA, Acosta AA, 1997. Effect of sperm viability, plasmalemma integrity, and capacitation on patterns of expression of mannose-binding sites on human sperm. *Arch Androl* 38:67-74.
- Yuan YY, He CN, Shi QX, 1998. GABA initiates the acrosome reaction and fertilizing ability in human sperm. *Sheng Li Xue Bao* 50:326-332.
- Yuan YY, Mao LZ, Shi QX, Roldan ERS, Yu SQ, 1999. Ca<sup>2+</sup>/GABA-induced polyphosphoinositide (PPI) breakdown and acrosome reaction (AR) in guinea pig spermatozoa. *Biol Reprod* 60 (Suppl. 1):160.
- Zamboni L, 1992. Sperm structure and its relevance to infertility. An electron microscopic study. *Arch Pathol Lab Med* 116:325-344.
- Zamir N, Barkan D, Keynan N, Naor Z, Breitbarth H, 1995. Atrial natriuretic peptide induces acrosomal exocytosis in bovine spermatozoa. *Am J Physiol* 269:E216-E221.
- Zeng Y, Clark EN, Florman HM, 1995. Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion. *Dev Biol* 171:554-563.

- Zhang JJ, Muzs LZ, Boyle MS, 1991. Variations in structural and functional changes of stallion spermatozoa in response to calcium ionophore A23187. *J Reprod Fertil Suppl* 44:199-205.
- Zhang H, Zheng RL, 1996. Promotion of human sperm capacitation by superoxide anion. *Free Radic Res* 24: 261-268.
- Zhang H, Ni J, Zhang W, Tian SJ, 2000. GABA inhibits progesterone production of luteal cells of rat ovary. *Sheng Li Xue Bao* 52:185-187.
- Zhang M, Tang H, Shen G, Zhou B, Wu Z, Peng Z, Zhang J, Yan J, Xia G, 2005. Atrial natriuretic peptide induces an acrosome reaction in giant panda spermatozoa and enhances their penetration of salt-stored porcine oocytes. *Theriogenology* 64:1297-1308.
- Zhang ZH, Chen WY, Shi QX, Yuan YY, Lou YC, 2000. Capacitating action of GABA and progesterone in spermatozoa of human and guinea pig in vitro. *Sheng Li Xue Bao* 52:179-184.
- Zhou R, Sky B, Chou KCK, Oswald MD, Hang A, 1990. Changes in intracellular calcium of porcine sperm during in vitro incubation with seminal plasma and a capacitation medium. *Biochem Biophys Res Commun* 172:47-53.
- Zini A, de Lamirande E, Gagnon C, 1995. Low levels of nitric oxide promote human sperm capacitation in vitro. *J Androl* 16:424-431.

## 13. APENDICE

### SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO

#### A) Soluciones para el procesamiento de muestras de semen

##### 1) Solución de citrato de sodio al 3%

Citrato de sodio	3 g
Penicilina	0,064 g
Sulfato de estreptomicina	0,101 g
Agua destilada, c.s.p.	100 ml

##### 2) Solución de Ficoll 400

Ficoll 400	400 g
Hepes	0,477 g
Tris	0,125 g
Fructosa	5,144 g
MgCl <sub>2</sub> 4M	100 µl
Sulfato de kanamicina	0,010 g
Agua destilada, c.s.p.	100 ml

pH= 7,3

Osmolaridad= 340 mOsm/kg

##### 3) Solución de cloramina-T

Cloramina-T	1 g
NaCl	0,9 g
Agua destilada, c.s.p.	100 ml

#### B) Soluciones para evaluaciones de muestras de semen

##### 4) Solución Madre de acetato de 6-carboxifluoresceína

Acetato de 6-carboxifluoresceína	4,6 mg
Dimetilsulfóxido (DMSO), c.s.p.	10 ml
Conservar en oscuridad a -20 °C.	

##### 5) Solución Madre de yoduro de propidio

Ioduro de propidio	5 mg
Solución fisiológica, c.s.p.	10 ml

Conservar en oscuridad a -20 °C.

6) Solución fisiológica

NaCl	0,9 g
Agua destilada, c.s.p.	100 ml

7) Solución Madre de formaldehido

Diluir formaldehido pro-análisis (36-38%) 1: 148 en agua destilada.

8) Solución de Trabajo de fluorocromos

Por cada mililitro de la Solución de citrato de sodio agregar:

- \* 20 µl de Solución Madre de formaldehido
- \* 20 µl de Solución Madre de acetato de 6-carboxifluoresceína
- \* 10 µl de Solución Madre de yoduro de propidio

Mantener en oscuridad y en baño térmico a 37 °C.

9) Diluyente para Test de Termorresistencia

Citrato de sodio	2,4 g
Fructosa	3 g
Yema de huevo	20 ml
Agua destilada, c.s.p.	100 ml

10) Solución de colorante Fast Green

Fast Green	2 g
Buffer fosfato salino (PBS), c.s.p.	100 ml

11) Solución de colorante Eosina B

Eosina B	0,4 g
Buffer fosfato salino (PBS), c.s.p.	100 ml

12) Solución Madre de Ionóforo A23187

Ionóforo A23187	26,18 mg
DMSO, c.s.p.	10 ml

13) Solución de Ionóforo A23187 en PBS

Solución Madre de Ionóforo A23187	10 $\mu$ l
PBS, c.s.p.	10 ml

14) Solución de ionóforo A23187 en Medio BWW

Solución Madre de Ionóforo A23187	10 $\mu$ l
Medio BWW, c.s.p.	10 ml

15) Solución control de ionóforo A23187 en Medio BWW

DMSO	10 $\mu$ l
Medio BWW, c.s.p.	10 ml

16) Solución de Hoechst 33258

Hoechst 33258	1 $\mu$ g
Solución de Citrato de sodio al 3%, c.s.p.	1 ml

17) Solución stock de marcación con lectina PSA

Lectina de <i>Pisum sativum</i> marcada con isitiocianato de fluoresceína	1 mg
PBS	10 ml

18) Solución stock de marcación con lectina PNA

Lectina de <i>Arachis hypogea</i> marcada con isitiocianato de fluoresceína	1 mg
PBS	10 ml

19) Solución stock de marcación con lectina WGA

Lectina de <i>Triticum vulgare</i> marcada con isitiocianato de fluoresceína	1 mg
PBS	10 ml

20) Solución de CTC

Clortetraciclina	20,61 mg
Buffer de CTC, c.s.p.	40 ml



21) Buffer de CTC

Tris	96,88 mg
NaCl	303,88 mg
Cisteína	24,24 mg
Agua destilada, c.s.p.	40 ml

pH= 7,8

22) Solución de detención de CTC

Glutaraldehido	1,25 ml
Solución Tris-HCl, c.s.p.	10 ml

23) Solución Tris-HCl

Tris	2,42 g
HCl, c.s.p.	10 ml

**C) Soluciones para congelamiento de semen ovino**

Para el congelamiento de semen ovino se utilizaron dos soluciones, llamadas Diluyente 1 y Diluyente 2, preparadas a partir de dos soluciones Madre A y Madre B.

24) Solución Madre A

Tes	5,25 g
Tris	1,26 g
Fructosa	0,2 g
Penicilina	0,167 g
Agua destilada, c.s.p.	100 ml

25) Solución Madre B

Leche en polvo descremada	11g
Sulfato de estreptomicina	0,264 g
Agua destilada, c.s.p.	100 ml

Se disuelve la leche en polvo descremada en agua destilada, luego se calienta en baño María hasta los 100 °C. Se deja a esta temperatura durante 5 minutos. Luego se deja enfriar hasta llegar a temperatura ambiente, y recién entonces se agrega el sulfato de estreptomicina.

26) Diluyente 1

Solución Madre A	38 ml
Solución Madre B	38 ml
Glicerol	4 ml
Fructosa	2,7 g
Agua destilada, c.s.p.	100 ml

27) Diluyente 2

Solución Madre A	38 ml
Solución Madre B	38 ml
Glicerol	4 ml
Yema de huevo	20 ml

**D) Medios para capacitación de espermatozoides**

28) Solución de lavado de espermatozoides

Albúmina Sérica Bovina (BSA)	3 g
Buffer fosfato salino (PBS), c.s.p.	1000 ml

29) Medio SOF (Fluido Oviductal Sintético)

Stock S2	11 ml
NaHCO <sub>3</sub>	16,8 mg
Stock H	6 ml
Piruvato de sodio	3,6 mg
CaCl <sub>2</sub>	25,2 mg
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	10,0 mg
Lactato de sodio (60%)	0,047 ml
Glucosa	10,8 mg
MEM-neaas	1 ml
BME-eaas	2 ml
BSA-FAF	300 mg
Agua destilada, c.s.p.	100 ml

Osmolaridad= 270-285 mOsm/Kg

Ajustar a pH= 7,4

Utilizar hasta 2 semanas después de preparado.

### 30) Solución Stock S2

NaCl	6,294 g
KCl	0,534 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,162 g
Penicilina	0,060 g
Sulfato de estreptomicina	0,050 g
Agua destilada, c.s.p.	100 ml

Guardar filtrado a 4 °C, hasta 3 meses.

### 31) Solución Stock H

Hepes ácido	15 g
Hepes, sal de sodio	16,25 g
Rojo fenol	50 mg
Disolver en H <sub>2</sub> O destilada, c.s.p.	500 ml

Osmolaridad= 384 mOsm/Kg

pH= 7.4-7.5

Guardar filtrado a 4 °C, hasta un mes.

### 32) Solución SOF-m

Stock S2	2 ml
NaHCO <sub>3</sub>	42,0 mg
Piruvato de sodio	0,72 mg
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	5,04 mg
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O (solución 4M)	2,46 µl
Lactato de sodio	9,4 µl
Glucosa	5,4 mg
Glutamina	2,92 ml
MEM-neaas	0,2 ml
BME-eaas	0,4 ml
BSA-FAF	160 mg
Penicilamina	0,06 mg
Hipotaurina	0,022 mg
Agua destilada, c.s.p.	20 ml

Osmolaridad= 265-275 mOsm/Kg

Ajustar a pH= 7,2-7,4

Preparar semanalmente.

33) Medio BWW (Biggers, Whitten y Whittingham)

Piruvato de sodio	0,028 g
Lactato de sodio	2,416 g
BSA	1,000 g
Solución Stock de BWW, c.s.p.	1 litro

Osmolaridad: 308 mOsm/Kg

pH= 7,4-7,5 en equilibrio con 5% CO<sub>2</sub> en aire.  
Preparar en el día de uso.

34) Solución Stock de BWW (Biggers, Whitten y Whittingham)

Na Cl	5,546 g
KCl	0,356 g
CaCl <sub>2</sub> anhidro	0,189 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,162 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,294 g
Glucosa	1,000 g
NaHCO <sub>3</sub>	2,106 g
Agua destilada, c.s.p.	1 litro

Preparar cada mes.

35) Medio BWW modificado (m-BWW)

Piruvato de sodio	0,028 g
Lactato de sodio	2,416 g
Hepes ácido	0,0024 g
Solución stock de BWW, c.s.p.	1 litro

Ajustar el pH a 7,4 con NaOH 0,1N

