



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES**

**"CUAUTITLAN"**

**RELACION ENTRE EL TIEMPO DE CAPACITACION  
Y EL CONTENIDO INICIAL DE AMP<sub>c</sub> EN LOS  
ESPERMATOZOIDES DE CUYO  
(Cavia porcella)**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**  
P R E S E N T A  
**JORGE MANUEL NACIFF HERNANDEZ**

**1985**

**Cuautitlán Izcalli, Estado de México**



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## RESUMEN

Se ha determinado que los espermatozoides de los mamíferos cuentan con todos los componentes del sistema del segundo mensajero. Debido al efecto que tiene la exposición de los espermatozoides al AMPc, a análogos de éste (db-AMPc u 8-Br-AMPc), así como a inhibidores de fosfodiesterasa de AMPc, se ha inferido que el AMPc participa en la regulación de procesos espermáticos tales como: tiempo de maduración epididimal, metabolismo, movilidad, tiempo de capacitación y aparición de la reacción acrosomal.

Se ha encontrado que el medio de incubación influye en el tiempo de capacitación espermática. Por otra parte, se ha visto que el nivel de AMPc intraespermático permanece esencialmente constante durante el período de capacitación, a excepción de un incremento substancial al inicio de la misma, in vitro. Estas observaciones nos llevaron a investigar si el contenido inicial de AMPc intraespermático tenía alguna influencia en el tiempo de capacitación.

Los espermatozoides de cuyo fueron incubados en diferentes medios capacitantes, a diferentes tiempos. Su contenido de AMPc se determino, por radioinmunoensayo, a 15 y 30 seg de iniciada la incubación. La capacitación se valoró cuantificando el % de la población que sufrió la Reacción Acrosomal.

Los espermatozoides de cuyo incrementaron abruptamente su

contenido basal de AMPc, dentro de los primeros 30 seg de incubación en los diferentes medios de incubación utilizados. La magnitud de este incremento fue dependiente de la composición del medio de incubación, siendo mayor cuando se incubó en un medio adicionado de glucosa, papaverina o ambas. La proporción de la población espermática que se capacitó a 5, 15, 30 o 60 min de incubación, no fue significativamente diferente entre un medio y otro, no obstante que el contenido inicial de AMPc intraespermático si fue diferente. Los espermatozoides con un contenido inicial de AMPc cercano al basal, parecen no capacitarse ni a 5 ni a 15 min de incubación en un medio capacitante.

Estos resultados sugieren que el incremento del contenido de AMPc parece no tener relación directa con el tiempo de capacitación de los espermatozoides de cuyo. Este AMPc parece activar, solamente, los mecanismos que permiten que el gameto adquiera la movilidad activa (dentro de 120 seg), requerida para la subsecuente fertilización del óvulo.

## INDICE

	Pag.
Abreviaturas .....	1
Introducción .....	2
Fertilización en los mamíferos .....	3
La capacitación espermática .....	18
La reacción acrosomal en los espermatozoides de mamífero .....	22
Antecedentes generales .....	30
Los nucleótidos cíclicos en el espermatozoide de los mamíferos .....	30
Funciones espermáticas relacionadas al AMPc .....	35
Antecedentes específicos .....	43
El AMPc y la capacitación espermática .....	43
Objetivo .....	49
Material y Métodos .....	50
Reactivos .....	50
Medios de incubación .....	50
Obtención de los espermatozoides .....	53
Lavado de los espermatozoides .....	54
Determinación de la concentración espermática .....	55
Incubación de los espermatozoides .....	55

Valoración de la capacitación y de la reacción acrosomal espermáticas .....	56
Determinación del contenido de AMPc intraespermático ...	58
Cuantificación del número de espermatozoides por su absorbancia a 260 nm .....	64
Parámetros estadísticos .....	66
Resultados .....	68
Discusión .....	96
Conclusiones .....	116
Bibliografía .....	119

## ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucléico
AMPC	3'5'-Fosfato cíclico de adenosina o AMP cíclico
ARN	Acido ribonucléico
ATP	5'-Trifosfato de adenosina
Cellex-T	Resina de intercambio aniónico
CTAB	Bromuro de cetil trimetilamonio. Detergente catiónico
D.O.	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido etilendiamino tetraacético, la sal disódica
G	Glucosa
MCM	Medio mínimo de cultivo
mM	Milimolar
$\mu$ M	Micromolar
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PD	Fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos
R.A.	Reacción acrosomal
SDS	Dodecil sulfato de sodio. Detergente aniónico
xg	Número de veces la gravedad
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano

## I N T R O D U C C I O N

Los primeros estudios sobre la reproducción de los animales se realizaron examinando el comportamiento de los gametos de los organismos que presentan fertilización externa. Esto principalmente se debe a que los óvulos y los espermatozoides de estos animales, particularmente los de invertebrados marinos, son ideales para el análisis de la fertilización y el desarrollo embrionario temprano, por dos razones principales: la fertilización y el desarrollo subsecuente de un nuevo organismo ocurren fácilmente en el laboratorio, por incubación de los gametos en agua de mar; y por que un gran número de gametos de ambos sexos pueden ser obtenidos, facilitando la investigación a nivel tanto bioquímico como molecular. De ahí que una gran parte del conocimiento relacionado a la interacción de los gametos para la reproducción se refiera a tales organismos. Por otra parte, el entendimiento de los procesos involucrados en la reproducción de los mamíferos se encuentra un tanto atrasado, ya que sólo recientemente se ha enfocado un mayor interés en su estudio (Bavister, 1980).

De la investigación del proceso de fertilización en invertebrados marinos se han identificado algunos de los eventos básicos de la misma, algunos de los cuales han sido observados también en los mamíferos, como son: la ocurrencia de la reacción acrosomal espermática (Chang, 1952; Austin, 1952); una necesidad de iones  $Ca^{2+}$  para la producción de dicha reacción (Dan, 1954; Yanagimachi y Usui,

1974; alteración del metabolismo de los nucleótidos cíclicos en el espermatozoide durante la reacción acrosomal (Garbers y Kopf, 1980); la especificidad de especie presentada en la interacción espermatozoide-óvulo (Hanada y Chang, 1972; Yanagimachi, 1972, 1977, 1978; Summers y Hylander, 1976; Kinsey y col., 1980); y otras. Desafortunadamente, existen suficientes disparidades en la fisiología y en la morfología entre los gametos de los mamíferos y los de los invertebrados marinos, que hacen imposible la extrapolación de todos los hallazgos obtenidos de la investigación de estos últimos, para comprender en detalle el proceso de la fertilización en mamíferos. Esto hace indispensable el estudio de los diferentes mecanismos involucrados en la fertilización de estas últimas especies.

#### *La fertilización en los mamíferos*

La reproducción en los mamíferos es un proceso notablemente complejo, con sus propios eventos fisiológicos y sistemas de control, que tiene como finalidad el desarrollo de un nuevo individuo de la misma especie. El cumplimiento de esta finalidad involucra al fenómeno denominado fertilización, que es la fusión de las células germinales especializadas (gametos) del macho y de la hembra (Bavister, 1980), para producir el huevo o cigoto, cuyo ulterior desarrollo originará un individuo de la misma especie (Austin y Short, 1982).

El espermatozoide y el óvulo son las células germinales especializadas masculina y femenina, respectivamente, y su característica principal es su haploidía en número de cromosomas y contenido de DNA. Este estado haploide es adquirido, en ambos gametos, a través de divisiones celulares de un tipo no usual (para las células somáticas), denominadas meiosis. Ambos gametos derivan de una línea de células diploides, denominadas células germinales primordiales, la cual es establecida durante la embriogénesis temprana. Las células germinales primordiales sufren las dos divisiones consecutivas de las que consta la meiosis; en la primera división (meiosis I), tanto el número de cromosomas como el contenido de DNA es dividido en dos partes iguales; en la segunda, sólo el contenido de DNA es dividido en dos partes iguales. Ya que antes de entrar a la primera profase meiótica, las células germinales duplican su DNA, al inicio de la meiosis están equipadas con una cuota de DNA de  $4n$ , después de las dos divisiones meióticas, quedan con una cuota de  $n$ , en términos de contenido de DNA y en un estado haploide.

Las células germinales especializadas son producidas en las gónadas, fisiológicamente maduras, por un proceso conocido como gametogénesis. El óvulo o gameto femenino es producido en el ovario durante la ovogénesis; y el espermatozoide o gameto masculino, es formado en el testículo, por el proceso denominado espermatogénesis (Austin y Short, 1982). El ciclo de vida de las

células germinales, femeninas y masculinas, se resume en la figura 1. Las células germinales, en ambos sexos, se dividen mitóticamente hasta, o poco después de, la diferenciación gonadal sexual. Todas las células germinales femeninas entran en meiosis en la vida fetal, en la mayoría de los mamíferos, mientras que las masculinas mantienen permanentemente su población celular, que puede dividirse mitóticamente y de la cual las células meióticas continúan para emerger por toda la vida adulta.

Con la fertilización, el óvulo recupera la diploidía característica de la especie (Bavister, 1980), al recibir el DNA (n) que porta el espermatozoide, dando origen al huevo. Para que ocurra esto, el gameto masculino debe adquirir la capacidad de fertilizar al óvulo (Bedford, 1970; Bavister, 1980; Bedford, 1983; Yanagimachi, 1984), por medio de procesos, aún no bien esclarecidos, que le ocurren durante su estancia en los tractos genital masculino, y femenino, hasta encontrarse, unirse y fusionarse con el óvulo, en el ampulla del oviducto (Talbot, 1984).

En la mayoría de los mamíferos euterianos, el óvulo recientemente ovulado (Fig. 2), consiste de una membrana celular propia del óvulo, o vitelo, rodeada por una cubierta glicoprotéica no celular, la zona pelúcida; contenido todo en una masa de pequeñas células, la corona radiada y el cúmulo oóforo (Bedford, 1983; Hartman, 1983; Schuell y col., 1983; Dunbar y col., 1984; Talbot, 1984); una matriz extracelular, conteniendo ácido hialurónico (entre otras

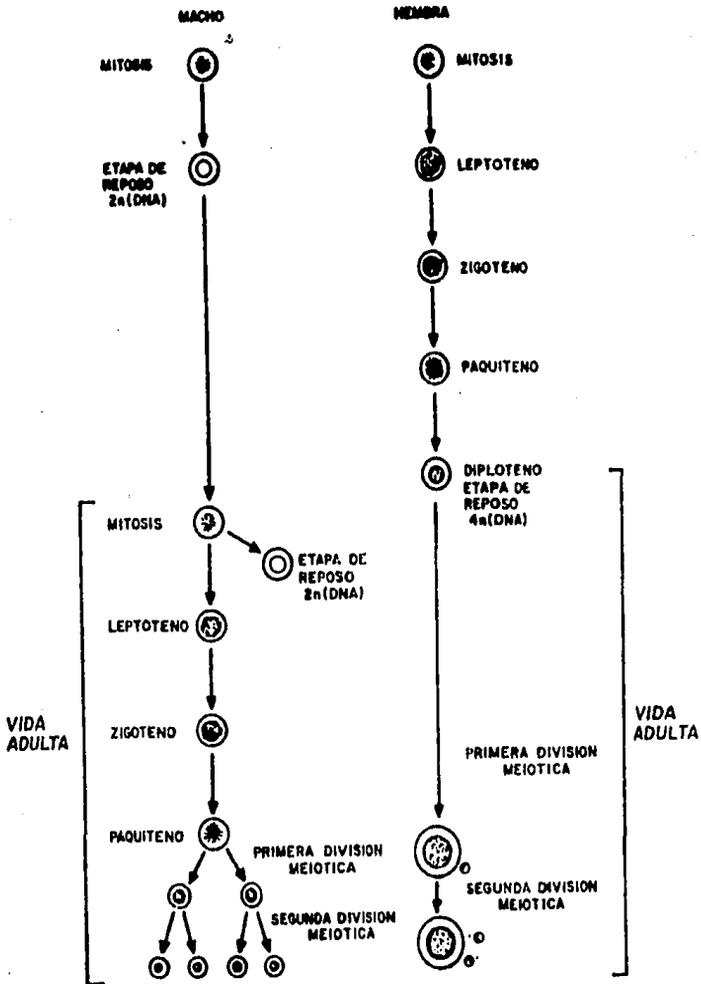


Fig. 1. Diagrama esquemático de la diferenciación secuencial que ocurre durante la gametogénesis. El volumen y características morfológicas de los diferentes tipos celulares, no son mostrados. (Adaptado de: Austin y Short, 1982).

cosas), y fluido folicular residual que separa a las células de la corona radiada y el cúmulus (Talbot, 1984). Por lo tanto, el espermatozoide que fertilice al óvulo debe penetrar la matriz extracelular del cúmulo oóforo y corona radiada y la zona pelúcida antes de atravesar el espacio perezvitelino y poder unirse y fusionarse con el oolema. Aunque Hartmann (1983) señala que las células del cúmulo oóforo y de la corona radiada se pierden, en algunas especies, en el trayecto recorrido por el ovocito, desde que es expulsado del folículo de DeGraff hasta su encuentro con el espermatozoide, en el ámpula de la trompa de Falopio, el espermatozoide de mamífero está bien diseñado para penetrar las cubiertas que recubren al óvulo, sin requerir que éstas se pierdan mecánicamente.

Los espermatozoides de mamífero están organizados, topográficamente, en dos segmentos principales: la cabeza y el flagelo (Fig. 2). La cabeza consiste de un núcleo más condensado y elongado que el de una célula somática, cubierto en su polo anterior por un complejo membranoso, organelo denominado acrosoma, que contiene entre otras cosas enzimas que, se ha sugerido, participan en la fertilización con papeles activos (Stambaugh, 1978). El núcleo del espermatozoide de mamíferos tiene una forma que es característica de cada especie, y ésta es adquirida al condensarse la cromatina por el aumento, en sus proteínas, del número de enlaces disulfuro internos, lo que lo hace metabólicamente inerte y sumamente resis-

sistente a la digestión (Fawcett, 1975). El arreglo de la cromatina dentro del núcleo espermático no ha sido definido adecuadamente, pero se sabe que está complejamente organizada; por estudios de criofractura de espermatozoides de varias especies de mamíferos (Bellvé y O'Brien, 1983), se sugiere que tiene un arreglo en láminas, aunque en el del humano y en el del ratón se ha sugerido que es fibrogranular. La extrema condensación y la forma no usual del núcleo espermático han sido atribuidas a la presencia de proteínas características en su cromatina. En varias especies de invertebrados y vertebrados, las histonas somáticas son reemplazadas durante la espermatogénesis por protaminas (proteínas más pequeñas y más básicas que las histonas), o por especies singulares de histonas (Bellvé y O'Brien, 1983). Las protaminas han sido identificadas en espermatozoides de varios mamíferos (Coelingh y col., 1972; Kistler y col., 1976; Kolk y Samuel, 1975; Gaastra y col., 1978), y se ha encontrado que algunas especies de mamíferos presentan en sus espermatozoides sólo un tipo de protamina. La cubierta nuclear de espermatozoide de los mamíferos tiene varias características estructurales no usuales. Consiste de dos membranas, y cada una contiene distintos patrones de partículas intramembranales (Stackpole y Devorkin, 1979). Cerca del polo caudal de la cabeza espermática, las membranas nucleares y la plasmática se fusionan para formar el anillo posterior (Friend y Fawcett, 1974), el cual aparentemente actúa como un sello que separa los compartimientos

de la cabeza y del flagelo.

El acrosoma del espermatozoide de mamíferos varía en forma y tamaño entre las diferentes especies, pero casi siempre consiste de lo siguiente (Meisel, 1978): una membrana continua que lo limita, compuesta de una región externa, que es la más próxima a la membrana plasmática, y una región interna, la cual está cercana a la membrana nuclear; el segmento ecuatorial o collar acrosomal, que es la región caudal particularmente estrecha del acrosoma, donde la membrana acrosomal interna y externa se unen; el espacio subacrosomal; en algunos casos conocido como el perforatorium, que semeja una raíz, y está localizado entre la parte anterior final del núcleo y el acrosoma; y la matriz acrosomal, compuesta de material granular, electrónicamente denso, no enlazado a las membranas. El que el acrosoma sea originado del aparato de Golgi durante la espermatogénesis y el que contenga enzimas hidrolíticas, lo hace comparable a un "lisosoma especializado" (Hartree, 1975; Stambaugh, 1978), Fawcett (1978) al exponer espermatozoides de toro a naranja de acridina encontró, que el acrosoma fluorecía al contacto con el colorante, ésta es una característica de los lisosomas, lo que apoya la consideración de Hartree y Stambaugh sobre el acrosoma.

Al flagelo del espermatozoide de mamífero se le ha subdividido, para su estudio, en cuatro segmentos discretos: el cuello, la pieza media, la pieza principal y la pieza terminal. El cuello es una región morfológicamente compleja, localizada inmediatamente

después de la cabeza, en la parte posterior del núcleo. La región del cuello incluye a la pieza conectora que sirve como base, fosa de implantación, al núcleo. El cuello forma la articulación entre la cabeza y el flagelo del espermatozoide (Browder, 1980). Usualmente es delgado y está constituido por la porción redundante de la membrana nuclear, una o dos mitocondrias que se proyectan anteriormente de la pieza media, los segmentos iniciales de las fibras densas externas y la extensión anterior del par de microtúbulos centrales del axonema (complejo de filamentos axiales), que es el aparato motor del flagelo espermático.

La pieza media del flagelo está caracterizada por el arreglo helicoidal de las mitocondrias que rodean a las fibras densas externas y al axonema central. La cubierta mitocondrial de la pieza media se considera que es la que genera la energía para la locomoción del espermatozoide (Fawcett, 1975; Oko y Krudka, 1982; y O'Brien, 1983). La pieza media termina en una estructura en forma de anillo (annulus), donde se fusiona con la membrana plasmática.

La pieza principal, el segmento más largo del flagelo del espermatozoide, también contiene al axonema en su parte central y a las fibras densas externas que lo rodean en este segmento, la hélice mitocondrial es reemplazada por una vaina fibrosa compuesta de una serie de costillas (de estructura filamentosa), orientadas en forma semicircular y soldadas en dos pilares longitudinales

opuestos (Fawcett, 1975).

El segmento más distal del flagelo espermático, la pieza terminal, contiene regiones de vaina fibrosa menos desarrolladas, remanentes de las columnas, el extremo terminal de algunas fibras densas y al axonema (Bellvé y O'Brien, 1983).

El espermatozoide está envuelto por un plasmalema que posee dominios funcionalmente distintos. Así, la membrana plasmática que cubre la región anterior de la cabeza, participa en la reacción acrosomal, mientras que la superficie del segmento ecuatorial o cápsula nuclear esta considerada como la zona responsable de la fusión inicial con el ovocito. Estudios de crío-fractura de los espermatozoides de mamífero indican diferencias regionales en el tamaño, la distribución y la densidad relativa de partículas intramembranales (Friend y Fawcett, 1974; Stackpole y Devorkin, 1974).

Parece haber una movilidad restringida de los componentes membranales intercalados (O'Rand, 1977), sobre todo en regiones que no pertenecen a la superficie postacrosomal de la cabeza. Los lípidos de la membrana espermática también parecen estar localizados en dominios discretos, se ha sugerido que las regiones membranales fusogénicas, localizadas en el acrosoma, contienen concentraciones elevadas de lípidos aniónicos (Bearer y Friend, 1982). Tales dominios lipídicos podrían facilitar los eventos de membrana que se presentan durante la capacitación y la reacción acrosomal.

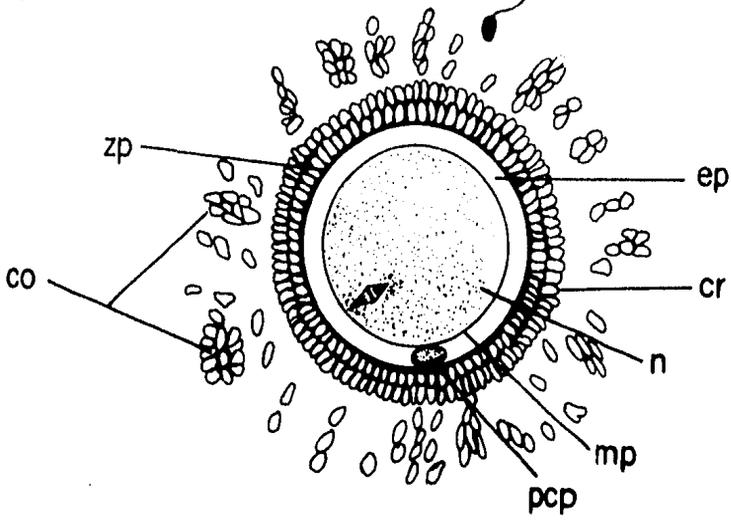
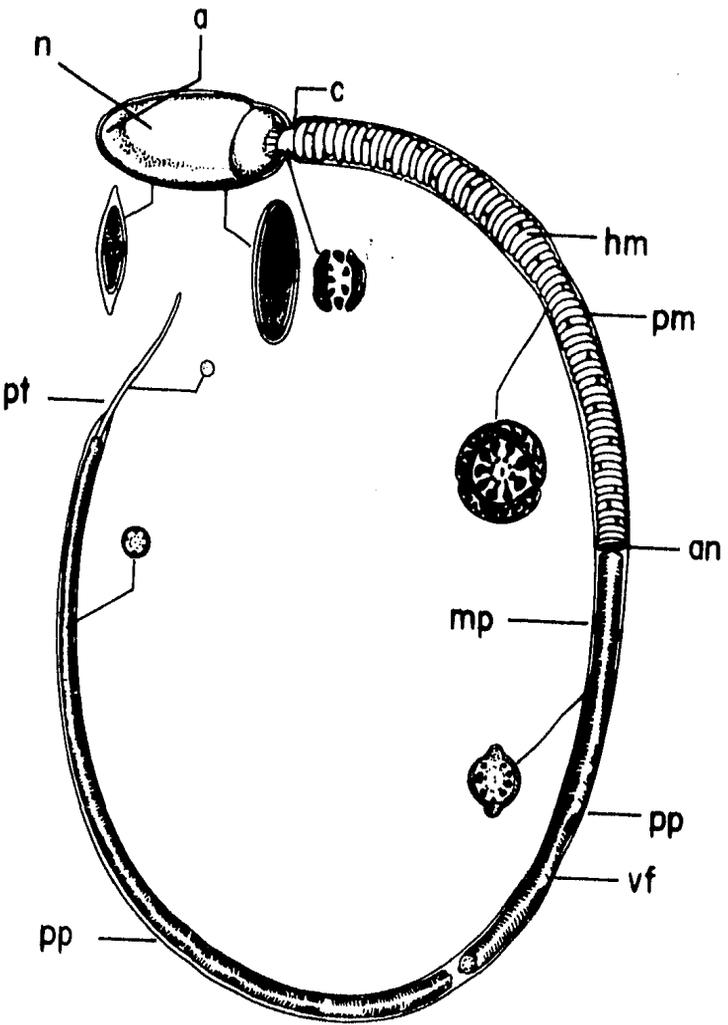
**A****B**

Fig. 2. Diagrama esquemático de la estructura característica de los gametos femenino y masculino de los mamíferos. Al ocurrir la ovulación, el óvulo (A) detenido en la metafase II de la segunda división meiótica, sale del folículo de De Graaf, rodeado por: el espacio perivitelino (ep), la zona pelúcida (zp), las células de la corona radiada (cr) y las del cúmulo oóforo (oo); y el primer cuerpo polar (pcp) que se encuentra en el espacio perivitelino. El espermatozoide (B) está formado por: La cabeza, que incluye al núcleo (n) y al acrosoma (a); al cuello (c); y el flagelo, que comprende a la pieza media (pm), que se caracteriza por el arreglo helicoidal de las mitocondrias (hm) que rodean al axonema, y termina en el anulo (an); a la pieza principal (pp), el segmento más largo del flagelo, donde la hélice mitocondrial es reemplazada por una vaina fibrosa (vf); y a la pieza terminal (pt), el segmento más distal del flagelo espermático que contiene regiones de vaina fibrosa menos desarrolladas. El espermatozoide está envuelto por la membrana plasmática (mp) que posee dominios funcionalmente distintos.

En el esquema (A), se puede distinguir la diferencia en las dimensiones de ambos gametos.

Myles y col., (1981) utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos de la superficie de espermatozoides de mamífero, encontraron que éstos contienen antígenos de superficie de localización discreta, formando dominios membranales dentro de las regiones acrosomal y postacrosomal, así como en el flagelo; y sugieren que estos antígenos podrían tener papeles funcionales en la capacitación, la reacción acrosomal o en la fertilización.

Los espermatozoides aparentemente maduros "morfológicamente", cuando abandonan los túbulos seminíferos testiculares, donde son producidos en gran número, aun no son capaces de moverse progresivamente y son incapaces de fertilizar al óvulo; pero, durante su paso lento a través del conducto epididimal, un órgano ductiforme adherido a la superficie posterior del testículo, los espermatozoides aun sufren cambios morfológicos y bioquímicos para adquirir la capacidad fertilizante (Fawcett, 1978; Bavister, 1980; Talbot, 1984).

Estos cambios maduracionales incluyen alteraciones estructurales sutiles, tanto en la cabeza espermática como en el flagelo, cambios en los constituyentes y en las propiedades de la membrana plasmática y, además adquieren la capacidad de moverse hacia adelante en forma sostenida (Bellvé y O'Brien, 1963). Los mecanismos involucrados en tal maduración epididimal aun no están bien dilucidados, pero se sabe que pueden ser influenciados por múltiples factores, tales como: concentración celular, los espermatozoides son concentrados

unas 20 veces, o más, durante su tránsito por el epidídimo; cambios en su microambiente, el fluido del epidídimo es diferente en su composición comparado con el fluido de los túbulos seminíferos, estas diferencias involucran disminución del pH, alteración de la composición iónica, marcada acumulación de carnitina y glicerilfosforilcolina. Además, proteínas específicas secretadas por el epidídimo parecen interactuar directamente con el espermatozoide (Ballvé y O'Brien, 1983; Noland y col., 1984; Talbot, 1984).

Después de su estancia en el epidídimo, los espermatozoides de los mamíferos aun son incapaces de fertilizar de inmediato al óvulo al ponerlos en contacto (Austin, 1951; Chang, 1951; Bedford, 1970; Bavister, 1980; Garbers y Kopf, 1980; Chang, 1984; Yanagimachi, 1984); ya que al ser depositados en el tracto genital femenino, o en un medio de incubación adecuado, *in vitro*, requieren de un tiempo determinado para que puedan ser capaces de fertilizar al óvulo. Durante este tiempo, el espermatozoide sufre una serie de alteraciones morfológicas y fisiológicas para adquirir la capacidad de fertilizar. Estas alteraciones morfológicas se han dividido en dos partes: la capacitación y la reacción acrosomal.

El término capacitación es una definición operacional (Chang, 1984; Talbot, 1984), y se refiere a la suma de eventos que le ocurren al espermatozoide de los mamíferos para poder sufrir la reacción acrosomal (Bedford, 1970; 1983; Clegg, 1983; Yanagimachi, 1984). El tiempo requerido para la capacitación espermática varía

entre las diferentes especies de mamíferos.

La reacción acrosomal originalmente era incluida como parte de la capacitación (Austin, 1952), pero a partir de Bedford (1970) se le ha considerado como un fenómeno separado. La reacción acrosomal consiste en la pérdida del acrosoma espermático y la liberación de su contenido. Este cambio morfológico muy aparente, le permite al espermatozoide penetrar las envolturas del óvulo (Meizel, 1978), unirse y fusionarse con la membrana plasmática del mismo, y con ello, fertilizarlo (Clegg, 1983; Talbot, 1984; Yanagimachi, 1984).

Inmediatamente después de que la cabeza del espermatozoide se ha incorporado dentro del citoplasma del óvulo, la cubierta del núcleo espermático desaparece y se inicia la descondensación de la cromatina nuclear (Battaglia y Gaddum-Rosse, 1984; Shalgi y Phillips, 1982).

Después de la fusión espermatozoide-óvulo, las propiedades de la membrana plasmática del gameto femenino cambian de tal manera, que elimina la posibilidad de que se fusione otro espermatozoide, es decir, bloquea la polispermia (Yanagimachi, 1984), de esta manera la singamia normal, esto es la combinación de sólo un pronúcleo masculino con el pronúcleo femenino, queda asegurada (Schmell y col., 1983). Este bloqueo de la polispermia es reforzado, en algunas especies, por la reacción de la zona pelúcida (Dumban y Wolgemuth, 1984). La fusión entre el ovocito y el espermatozoide también dispara la activación del citoplasma del

óvulo causando, entre otras cosas, la exocitosis de los gránulos corticales. El material de los gránulos corticales interactúa con la zona pelúcida y la modifican (reacción de la zona pelúcida), de tal manera que se torna impermeable al paso de más espermatozoides (Dumban y Wolgemuth, 1984; Yanagimachi, 1984).

El mecanismo preciso desarrollado para el bloqueo de la polispermia depende de la especie. Los óvulos de algunas especies (p. ej., el conejo) dependen casi exclusivamente del bloqueo causado por la membrana plasmática del ovocito, y los de otras especies (p. ej., el ratón) parecen utilizar los dos mecanismos para prevenir el paso de más de un espermatozoide hacia el citosol del ovocito; los óvulos de otras especies (p. ej., el hámster dorado) parecen depender únicamente de la reacción de la zona pelúcida para bloquear la polispermia (Yanagimachi, 1984).

La activación del citoplasma del gameto femenino permite que el núcleo del espermatozoide se descondense y desarrolle para formar el pronúcleo espermático. Al mismo tiempo, los cromosomas del óvulo, detenidos en la metafase de la segunda división meiótica antes de la entrada del espermatozoide al citosol, por la penetración del espermatozoide completan sus meiosis y forman el pronúcleo femenino, y es expulsado el segundo cuerpo polar (Edwards, 1980; Austin y Short, 1982). La síntesis de DNA y la duplicación de cromosomas en ambos pronúcleos ocurren más o menos sincrónicamente con el desarrollo de los mismos (Wolgemuth, 1983). La activación del óvulo y el rearrreglo del sistema del citoesqueleto que la

acompañía, llevan a los pronúcleos en desarrollo al centio del huevo, donde, una vez que se han desarrollado totalmente, quedan en una aproximación muy cercana y su cubierta se desintegra y sus cromosomas se aparean para la primera división celular mitótica del nuevo ser que se desarrollará (Yanagimachi, 1984).

El intervalo de tiempo que transcurre a partir de la entrada del espermatozoide al citosol hasta la primera división del huevo es de más de 12 horas en la mayoría de los mamíferos; en el humano, por ejemplo, es de 28 horas.

#### *La capacitación espermática*

Hace más de 30 años que los primeros estudios sobre el proceso de la capacitación fueron realizados (Austin, 1951; Chang, 1951), cuando se observó que los espermatozoides inyectados dentro del saco periovárico de la rata o en el oviducto de la coneja eran incapaces de penetrar al ovocito inmediatamente, y que requerían de un período determinado de permanencia en el tracto genital femenino para adquirir el estado funcional, en el cual pueden fertilizar óvulos. Este estado funcional es alcanzado cuando el espermatozoide ha sufrido dos procesos indispensables; la capacitación y la reacción acrosomal (Austin, 1951; Chang, 1951; 1984; Bedford, 1970, 1983; Clegg, 1983; Talbot, 1984; Yanagimachi, 1984).

La capacitación de los gametos masculinos de los mamíferos se ha definido como la suma de cambios bioquímicos, ultraestructurales y fisiológicos que le deben ocurrir para poder sufrir la reacción

acrosomal (Bedford, 1970). La capacitación es un proceso espermático básico para que el gameto pueda fertilizar al óvulo a la hora y en el lugar adecuado; sus facetas parecen reflejar nuevos mecanismos de control celular sobre la interacción de los gametos en la reproducción de los mamíferos euterianos (O'Rand, 1982; Bedford, 1983). Su duración podría controlar el tiempo previo a la interacción entre el espermatozoide y el óvulo, vía control de la expresión de la reacción acrosomal (O'Rand, 1982), ya que los cambios espermáticos observados concomitantes con la capacitación están posiblemente relacionados directamente a la preparación para la fusión de las membranas plasmática y acrosomal externa del gameto.

Las bases bioquímicas de la capacitación espermática no están totalmente dilucidadas, pero existen varias líneas de evidencias que indican que el proceso de capacitación involucra a los siguientes eventos:

1. Una disminución de la carga negativa neta, por alteración de las terminales de ácido glucurónico y/o hialurónico (Vaidya y col., 1971)
2. Remoción de un factor(es) unido a la membrana plasmática espermática que impide la capacitación (factor descapacitante o factor estabilizante de la membrana) (Williams y col., 1976; Oliphant, 1976), cuyo origen es el líquido del epidídimo y/o el plasma seminal (Chang, 1957; Weinman y Williams, 1964). Así como la pérdida de componentes específicos de la membrana plasmática (Brackett y Oliphant, 1975; Oliphant, 1976)

3. Aumento en el metabolismo glucolítico (Hamner y Williams, 1963)
4. Aumento en la velocidad de respiración (Hamner y Williams, 1963)
5. Alteración de sitios espermáticos que unen lectinas (Schwarz y Koheler, 1979), y de sitios de unión de anticuerpos específicos (Koheler, 1976; O'Rand, 1979)
6. Disminución del contenido de colesterol de la membrana plasmática (Brackett y Oliphant, 1975); incremento en el contenido de fosfolípidos de la membrana plasmática (Davis y col., 1980); disminución de la relación colesterol/fosfolípidos (Davis y col., 1979, 1980); incremento en la metilación de fosfolípidos membranales (Llanos y Meizel, 1983)
7. Cambios en las propiedades osmóticas de la membrana plasmática (Summers y col., 1976), y cambios en su permeabilidad
8. Cambios en la fluidez de las membranas plasmática y acrosomal externa (Brackett y Oliphant, 1975)
9. Incremento en el influjo de iones  $\text{Ca}^{+2}$  (Singht y col., 1978), formación de canales iónicos en las membranas plasmática y acrosomal externa y formación de gradientes iónicos a través de ellas, manteniendo niveles intracelulares elevados de  $\text{K}^+$  y bajos de  $\text{Na}^+$  (Edwards, 1980)
10. Aparición, en las membranas plasmáticas y acrosomal exter-

na, de zonas carentes de partículas intercaladas, zonas de aclaramiento consideradas como posibles puntos de fusión intermembranal durante la reacción acrosomal (Friend, 1974, 1977, 1983)

11. Incremento en la actividad de la adenilato ciclasa (Morton y Albagli, 1973; Stein y Fraser, 1984); disminución de la actividad de la fosfodiesterasa de nucleotidos cíclicos (Stein y Fraser, 1984), e incremento de los niveles de AMPc intraespermáticos (Hyne y Garbers, 1979; Mrsny y Meizel, 1980; Fraser, 1981; Stein y Fraser, 1984)
12. Incremento en la movilidad espermática (Yanagimachi, 1970; Yanagimachi y Usui, 1974; Cornett y Meizel, 1978; Mrsny y col., 1979)

Es importante hacer notar que todos los eventos señalados se ha observado que ocurren durante el tiempo que toma el proceso denominado capacitación, sin embargo, no se tiene la certeza si son parte del mismo, o si son concomitantes con él. Por otra parte, las modificaciones espermáticas que ocurren durante este proceso no parecen requerir factores externos específicos de especie (De Mayo y col., 1980; Saling y Bedford, 1981), y ésto enfatiza que cuando menos en parte, el proceso de la capacitación espermática en los espermatozoides de mamífero sea de naturaleza endógena (O'Rand, 1982).

*La reacción acrosomal en los espermatozoides de los mamíferos*

El acrosoma de los espermatozoides de los mamíferos sufre una profunda modificación morfológica, denominada reacción acrosomal (RA), en el tracto genital femenino, o en condiciones adecuadas de incubación *in vitro*. *In vivo* ocurre poco antes de, o durante (Yanagimachi y Usui, 1974), el contacto con las envolturas del óvulo. Aunque el significado preciso de la RA no se ha determinado aun totalmente, se asume que es un proceso que sólo le ocurre al espermatozoide capacitado (Bedford, 1970, 1983; Fawcett, 1975; Meizel, 1978; Hyne y Garbers, 1979; Moore y Bedford, 1983), y que le debe ocurrir al gameto para que pueda atravesar las envolturas del óvulo, unirse y fusionarse con el oolema y así fertilizar al gameto femenino.

La RA es un evento totalmente dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$  extracelular (Yanagimachi y Usui, 1974; Hyne y Garbers, 1979; Garbers y Kopf, 1980), y sus eventos secuenciales son:

1. La fusión, en múltiples sitios, de las membranas acrosomal externa y plasmática que la cubre, con la producción de vesículas mixtas y formación de poros a través de ambas membranas, creando un acrosoma fenestrado (perforado) que permanece por algún tiempo (Green, 1982; Meizel, 1978). También ocurre un aumento del volumen del acrosoma, aunque no se sabe con certeza si es causado por la vesiculación membranal y la formación subsecuente de poros que permiten la entrada de electrolitos al acrosoma con el consiguiente

hinchamiento del mismo, o si, ocurre primero el hinchamiento debido al aumento de la presión osmótica coloidal dentro de la matriz acrosomal, que induce la fusión y vesiculación intermembranal (Yanagimachi y Usui, 1974; Green, 1978), aunque recientemente, Green (1982) mostró datos que refuerzan la idea de que es el aumento del volumen del acrosoma lo que permite el acercamiento de las membranas acrosomal externa y plasmática y facilita su fusión, la pregunta: ¿Cómo se induce el aumento en la presión osmótica de la matriz acrosomal?, permanece sin respuesta. La RA se asemeja a un proceso de exocitosis, pero su duración es más larga que un evento propiamente exocítico que ocurre en otros sistemas; por ejemplo, en el cuyo, desde el hinchamiento del acrosoma hasta su desaparición transcurren de 3 a 6 min (Yanagimachi y Usui, 1974)

2. La liberación del contenido acrosomal, constituido por electrolitos y enzimas, de las cuales se han identificado las siguientes: Hialuronidasa, acrosina, proacrosina, esterases, neuraminidasa, fosfatasas ácidas, fosfolipasa A, arilsulfatasas, beta-N-acetil-glucosaminidasa, arilamidasa, proteinasas ácidas y colagenasas (Stambaugh, 1978). Al inicio de la liberación del contenido acrosomal, se retiene gran parte de la membrana plasmática que cubre al acrosoma y con ella, a los posibles receptores que se

propone se unen a la zona pelúcida del óvulo (Moore y Bedford, 1983)

3. La exposición de la membrana acrosomal interna, que presenta actividad proteolítica posiblemente debido a acrosina unida a ella (Morton, 1975)
4. Refusión de la membrana plasmática con el residuo de la membrana acrosomal externa, a nivel de la región ecuatorial; la RA está limitada a la región rostral del acrosoma y progresa caudalmente sólo hasta el margen anterior del segmento ecuatorial (Fig. 3), donde ocurre la fusión de las membranas plasmática y acrosomal externa residual, para dar continuidad a la membrana plasmática del espermatozoide. En investigaciones utilizando polimixina B y filipina se ha mostrado (antibióticos que actúan a nivel de membrana) que, antes del inicio de la RA, el plasmalema rostral espermático es rico en lípidos aniónicos, constituyentes que incrementan la fluidez de las membranas y facilitan la fusión de éstas (Bearer y Friend, 1981)
5. Reorganización de las partículas intramembranales de la membrana plasmática, en la región ecuatorial o en la postacrosomal, para constituir la zona que reconocerá a la membrana plasmática del óvulo (Fawcett, 1975; Meizel, 1978; Austin y Short, 1982). Observaciones recientes (Bedford y col., 1979; Moore y Bedford, 1983) de las primeras etapas de la interacción óvulo-espermatozoide,

sugieren que la fusión de los gametos probablemente ocurre primero sobre algún punto del plasmalema espermático dentro de la zona limitada por la región ecuatorial y la región postacrosomal

Como se ha mencionado, los cambios que le ocurren al espermatozoide, sobre todo a nivel de membranas plasmática y acrosomal externa, durante la capacitación, lo predisponen a sufrir la RA, pero el origen y la naturaleza de los factores y mecanismos que específicamente la inician *in vivo*, aun no se han esclarecido completamente.

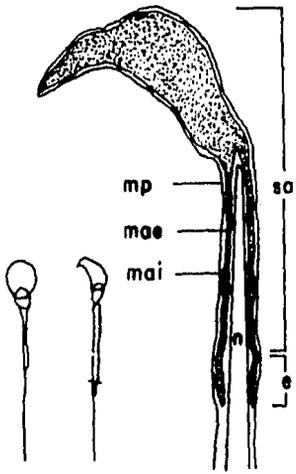
Los resultados de investigaciones en varios tipos de células de mamífero favorecen la idea de que la fusión de membranas es precedida por la formación de zonas de bicapa lipídica libres de proteínas intercaladas, debido a su agregación en otras zonas (formando parches) (Ahkong y col., 1975), esto, en el espermatozoide, se ha observado en la región anterior del acrosoma (Friend y col., 1977), y particularmente en el límite con el segmento ecuatorial donde la fusión de las membranas plasmática y acrosomal externa es esencial para la integridad de la célula. La movilidad lateral de las proteínas, podría deberse a cambios en la composición lipídica de las membranas durante la capacitación, como la reducción local de colesterol y el aumento de fosfolípidos (Brackett y Oliphant, 1975; Davis y col., 1979, 1980), así como el incremento en la metilación de tales fosfolípidos (Llanos y Meizel, 1983), lo que podría

incrementar la fluidez de las membranas. Parece que las proteasas acrosomales no están implicadas en el proceso de la RA, dado que ésta ocurre en presencia de inhibidores de ellas (Green, 1978; Perreault y col., 1982).

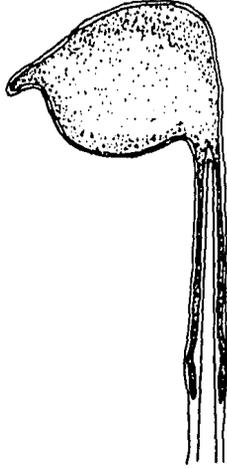
En cuanto al  $\text{Ca}^{+2}$ , se sabe que es indispensable su presencia en el medio de incubación para que ocurra la RA; pero no hay evidencias concretas que indiquen que papel exactamente juega. Papahadjopoulos (1978) propone que tiene una influencia directa en el proceso de la fusión membranal, actuando directa o indirectamente para producir desestabilización de la bicapa lipídica. Directamente podría inducir una transición de fase de la membrana, creando áreas de lípidos cristalinos y no cristalinos, o sea, regiones inestables que podrían promover la fusión de las membranas; este proceso podría ser influenciado, en el espermatozoide, por la acción de fosfolipasas (Hirao y Yanagimachi, 1978). O bien, la desestabilización de la bicapa lipídica podría ser inducida indirectamente, ya sea por la participación del complejo Ca-calmodulina y/o de cinasas de proteínas específicas. La calmodulina, proteína que une  $\text{Ca}^{+2}$  específicamente, envuelta en procesos regulatorios celulares mediados por  $\text{Ca}^{+2}$  (Means y col., 1982), también ha sido implicada en procesos de exocitosis y fusión membranal (Steinhardt y Alderton, 1982), ha sido localizada en el espermatozoide del conejo y del cuyo (Jones y col., 1980).

Por otra parte, la participación de cinasas de proteínas específicas, a su vez, puede implicar en el proceso a la adenilato

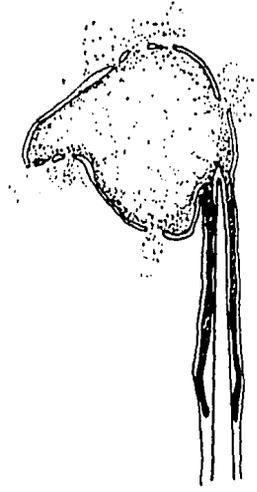
ciclasa, al AMPc y a las catecolaminas (Meizel, 1978; Moore y Bedford, 1983).



**A**



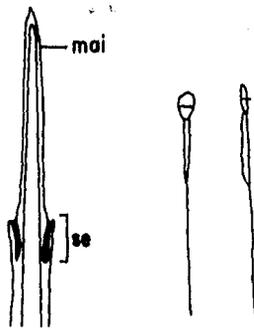
**B**



**C**



**D**



**E**

Fig. 3. Representación diagramática de las etapas secuenciales de la reacción acrosomal en el espermatozoide del cayo. (A) antes de que se inicie la reacción acrosomal; (B) hinchamiento y c) fusión del acrosoma, en múltiples sitios, de las membranas acrosomal externa y plasmática que la cubre; (D) liberación del contenido acrosomal, exposición de la membrana acrosomal interna y refusión de la membrana plasmática con el residuo de la membrana acrosomal externa; (E) la reacción acrosomal se ha completado y la región ecuatorial o postacrosomal puede unirse ya al oolema del óvulo para fusionarse con él. Sa, segmento anterior del acrosoma; se, segmento ecuatorial; mai, membrana acrosomal interna; mae, membrana acrosomal externa; n, núcleo; mp, membrana plasmática.

## A N T E C E D E N T E S

*Los nucleótidos cíclicos en el espermatozoide de los mamíferos*

Componentes del sistema del segundo mensajero en el espermatozoide de los mamíferos.

Está establecido que los espermatozoides de los mamíferos contienen tanto adenosín-3',5'-monofosfato cíclico (AMPC), así como guanosín-3',5'-monofosfato cíclico (GMPC), aunque este último en menor proporción (Gray, 1971; Hoskins y Casillas, 1975; Rogers y Kopf, 1980); además, las enzimas requeridas para la síntesis (adenilato ciclasa y guanilato ciclasa, respectivamente); para la expresión fisiológica (quinasas de proteínas dependientes de AMPC y de GMPC); para su degradación (fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos); así como fosfatasas de las proteínas fosforiladas por las cinasas dependientes del AMPC.

La adenilato ciclasa

Es la enzima que sintetiza AMPC a partir del complejo ATP-Mg; en el espermatozoide, a diferencia de otras células, la enzima no es estimulada ni por la toxina del cólera (Chang y Boettcher, 1979), ni por el fluoruro, pero sí por el catión divalente  $Mn^{+2}$  (hasta 50 veces) (Hoskins y Casillas, 1971). Su actividad se encuentra localizada primariamente en la fracción particulada del espermatozoide, aunque Herman y col., (1976) recuperaron al menos 30% del total de la actividad enzimática, de espermatozoides de toro, en

la fracción soluble. La adenilato ciclasa se ha demostrado en los espermatozoides de: humano, erizo de mar (Gray y col., 1976), mono (Casillas y Hoskins, 1970), hámster (Morton y Albagli, 1973), rata (Braun y Dods, 1975), toro (Braun, 1975), carnero (Towns y Luke, 1976), cuyo (Hyne y Garbers, 1979), chivo y búfalo (Chaundhry y Anand, 1975), y cerdo (Berger y Clegg, 1977).

En los espermatozoides de cuyo, la actividad de la adenilato ciclasa es aumentada por la presencia del  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{HCO}_3^-$ , se piensa que este aumento de la actividad enzimática es mediado por la calmodulina (Garbers y Kopf, 1980). En los espermatozoides de hámster, la adenilato ciclasa es activada durante la incubación de los gametos *in vitro* (Garbers y Kopf, 1980); y lo mismo sucede en los espermatozoides de cuyo (Hyne y Garbers, 1979), ratón (Fraser, 1981; Stein y Fraser, 1984), y en los de cerdo (Berger y Clegg, 1977).

Se postula que la adenilato ciclasa es un sistema compuesto de al menos tres proteínas: una catalítica, que no muestra ningunas propiedades reguladoras; otra, que une nucleótidos de guanina y regula la actividad de la proteína catalítica al interaccionar con ella y con la tercera proteína del sistema, la cual funje como receptor de la señal extracelular. La proteína catalítica es la que se une al complejo Mg-ATP para producir AMPc y Mg-PPi (Ross y Gilman; Hildebrandt y col., 1984).

#### Fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos

Estas enzimas inicialmente fueron descritas por Gray y col.,

(1976), quienes demostraron que los nucleótidos cíclicos eran degradados tanto en el espermatozoide de humano como en los de erizo de mar, aunque su presencia ya se había inferido por estudios con inhibidores (papaverina, cafeína, metilxantinas) y activadores (imidazol, AMPc externo) de las mismas (Casillas y col., 1970; Garbers y col., 1971). Existen varias formas isoenzimáticas de las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos, detectadas tanto por técnicas de separación protéica (cromatografía de intercambio iónico, perfiles de filtración en gel, etc.), así como por su especificidad de substrato (Garbers y Kopf, 1980; Tash y Means, 1983).

En el espermatozoide de mamífero, estas enzimas no parecen requerir del complejo  $\text{Ca}^{+2}$ -calmodulina para su activación; aunque, Wasco y Orr (1984), encontraron una fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos dependientes de  $\text{Ca}^{+2}$ -calmodulina, asociada con la cabeza y con el flagelo de espermatozoides desmembrados, obtenidos de la cauda de epidídimo de rata.

La actividad de fosfodiesterasa de GMPc, en el espermatozoide, se encuentra principalmente en la fracción particulada, mientras que la de AMPc está distribuída entre las fracciones particulada y soluble (Garbers y Kopf, 1980; Bhatnagar y Anand, 1982; Tash y Means, 1983). La actividad de fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos se encuentra distribuida tanto en cabeza (50% de la actividad total), pieza media, así como en el flagelo (Bhatnagar y Anand, 1982).

Cinasas de proteínas dependientes de AMPc.

En las células eucarióticas la única acción conocida del AMPc

es la activación de cinasas de proteínas dependientes de este nucleótido (Rosen y col., 1975). Estas enzimas se han encontrado en espermatozoides de varias especies de mamíferos (Garbers y col., 1973; Hoskins y col., 1972, 1974; Lee e Iverson, 1975), y representan una proporción significativa de las proteínas espermáticas.

Los substratos endógenos específicos de ellas (proteínas específicamente fosforilables por cinasas dependientes de AMPc), se han encontrado en el citoplasma de espermatozoides de bovino (Brandt y Hoskins, 1980), en espermatozoides intactos de humano (Huacuja y col., 1977), y de rata (Chulavatnatol y col., 1982), en solubilizados de espermatozoides de perro (Tash y Means, 1982; Tash y col., 1984), y en membrana plasmática de espermatozoides del epidídimo de bovino (Noland y col., 1984) y del espermatozoide eyaculado de perro (Tash y col., 1984).

Las cinasas de proteínas dependientes de AMPc existen en dos formas isoenzimáticas principalmente, denominadas tipo-I y tipo-II, resueltas por cromatografía en DEAE-celulosa (Hoskins y col., 1971). Ambas isoenzimas están constituidas por dos subunidades: la reguladora, que se une al AMPc, y la catalítica, que se activa al disociarse de la reguladora para fosforilar a la proteína blanco. Estas isoenzimas se diferencian por su subunidad reguladora, dado que son diferentes estructuralmente y además presentan diferente afinidad por el AMPc (Steinberg, 1984; Litvin y col., 1984),

Usando anticuerpos monoespecíficos dirigidos contra la subunidad catalítica y un segundo anticuerpo marcado con fluoresceína, Tash y Means (1982) localizaron microscópicamente a la cinasa de proteínas tipo-I, tanto en la cabeza como en el flagelo del espermatozoide de perro. Garbers y Kopf (1980a) encontraron, por cromatografía de intercambio iónico, que las dos isoenzimas se encuentran en el citosol del espermatozoide de bovino; mientras que Horowitz y col., (1984), utilizando marcaje por fotoafinidad con 8-acido AMPc ( $P^{32}$ ) encontraron que la cinasa de proteínas dependiente de AMPc tipo-I está asociada predominantemente a la membrana plasmática del espermatozoide de rata, mientras que la isoenzima tipo-II se encuentra principalmente en el citoplasma y en las estructuras resistentes al detergente Triton X-100.

#### Fosfatasa de proteínas.

La reacción opuesta a la fosforilación de las proteínas es su desfosforilación, catalizada por fosfatasas de proteínas. Niveles significativos de actividad de una enzima capaz de desfosforilar proteínas, previamente fosforiladas por cinasa dependientes de AMPc (fosfatasa proteica), han sido cuantificados en espermatozoides del epidídimo de bovino y de erizo marino (Tang y Hoskins, 1975; Swarup y Garbers, 1982). En ambas especies, la enzima está distribuida tanto en la fracción soluble como en la particulada, de la cabeza y del flagelo espermáticos.

Los mecanismos involucrados en la regulación de la actividad de estas fosfatasas aun no se conocen; aunque, las observaciones de

Swarup y Garbers (1982), de que en el espermatozoide de erizo marino, la actividad de fosfatasa de proteínas es estimulada por un factor ovular rico en fucosa, sugieren que no sólo la fosforilación, sino también la desfosforilación de proteínas específicas, así como el recambio del fosfato proteínico pueden ser importantes para la función espermática.

En general, el espermatozoide cuenta con todos los componentes del sistema del segundo mensajero (concepto establecido por Sutherland y col., 1960) que se caracteriza por el primer mensajero, generalmente una hormona, al interaccionar con su receptor, en la célula blanco, induce una estimulación de la adenilato ciclasa intramembranal, que se traduce en un aumento del nivel intracelular de AMPc (excepcionalmente ocurre lo contrario), el cual se une con la unidad reguladora de las cinasas de proteínas dependientes de él, para que la unidad catalítica fosforile a la proteína específica y ésta desencadene una serie de eventos que conducen a la respuesta fisiológica característica de la acción hormonal en la célula específica (Pastan, 1972).

#### *Funciones espermáticas relacionadas al AMPc*

Aunque no se ha identificado aún la señal(es) primaria que induce la elevación de los niveles intracelulares de AMPc en el espermatozoide de los mamíferos, sí se han observado varios efectos en él, inducidos por la alteración de sus niveles de AMPc, producida tanto por la adición al medio de incubación de AMPc o

análogos de éste más permeables (dibutiril-AMPC, 8-AMPC), así como por la utilización de inhibidores de la fosfodiesterasa del AMPC (efectos) que son similares a eventos fisiológicos observados en condiciones naturales en el espermatozoide.

Las funciones espermáticas asociadas con cambios en el contenido de AMPC intracelular que se han descrito son:

1. la maduración de los espermatozoides en el epidídimo
2. la movilidad espermática
3. el metabolismo espermático
4. la capacitación
5. la reacción acrosomal

La maduración de los espermatozoides en el epidídimo.

Hoskins y col. (1974), demostraron que las concentraciones de AMPC de los espermatozoides de bovino se incrementan durante el paso de los gametos de la cabeza a la cuada del epidídimo; Amann y col. (1982) encontraron los mismos resultados en carnero. Por otra parte, se ha sugerido que el AMPC es uno de los factores requeridos por el espermatozoide para que pueda adquirir la capacidad de moverse en forma progresiva (Hoskins y col., 1974; Garbers y Kopf; 1980; Amann y col., 1982; Tash y col., 1982, 1984; Noland y col., 1984).

Morisawa y Okuno (1982) sugieren que el AMPC induce la maduración del axonema espermático de trucha para que el gameto pueda iniciar su movilidad; así mismo, Treepitipatit y Chulavatnatol (1982) utilizando espermatozoides de epidídimo de rata, encontraron que el aparato móvil espermático es funcionalmente sensible al ATP y al AMPC. Estos resultados sugieren que el AMPC se requiere para

la maduración de los gametos en el epidídimo.

La movilidad espermática,

La participación del AMPc en la regulación de la movilidad de los espermatozoides maduros ha sido bien estudiada. Garbers y col. (1971) indicaron que la movilidad de los espermatozoides de la cauda del epidídimo es estimulada por varios inhibidores de fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos. Estudios subsecuentes han demostrado efectos estimulatorios similares tanto por inhibidores de fosfodiesterasas como por análogos del AMPc, en espermatozoides de la cauda del epidídimo o eyaculados de varias especies de mamíferos (Garbers y Kopf, 1980; Bellvé y O'Brien, 1983; Tash y Means, 1983; Jiang y col., 1984).

Aparentemente tanto la intensidad de la movilidad (evaluada por criterios subjetivos o por determinaciones más cuantitativas tales como la frecuencia de agitación del flagelo), como el número de espermatozoides móviles son aumentados por estos tratamientos (Lindeman, 1978; Tash y Means, 1982; Treetipsatit y Chulavatnatol, 1982; Yeung, 1984).

Aunque se ha sugerido que el AMPc puede actuar directamente en el aparato móvil para estimular la movilidad espermática (Lindeman, 1978; Tash y Means, 1982), el AMPc marcado no se une al axonema pero sí se asocia a componentes de peso molecular elevado en el citosol (Lindeman y col., 1981). Hay evidencias que indican que la acción del AMPc en la regulación de la movilidad espermática es vía

fosforilación de proteínas específicas (Tash y Means, 1983; Tash y col., 1984; Noland y col., 1984; Horowitz y col., 1984); no obstante que Tash y Means (1982) identificaron a la subunidad alfa de tubulina como la proteína fosforilada por cinasas de proteínas dependientes de AMPc, en espermatozoides eyaculados de perro, aun no se ha aclarado si la fosforilación del axonema está verdaderamente implicada en la regulación de la movilidad del espermatozoide vía AMPc.

Por otra parte, es posible que las proteínas fosforiladas por cinasas dependientes de AMPc, tanto en membrana plasmática como en citosol, participen en mecanismos que regulan la movilidad espermática (Noland y col., 1984; Yeung, 1984).

El metabolismo espermático.

Los espermatozoides de mamífero poseen una vía glucolítica activa (Mann y Lutwak-Mann, 1981), y pueden mantener su viabilidad en presencia de substratos glucolisables, bajo condiciones tanto aeróbicas como anaeróbicas. Los espermatozoides de varias especies de mamíferos utilizan fosfolípidos (plasmalógenos), como substratos endógenos secundarios para obtener energía (Garbers y Kopf, 1980; Mann y Lutwak-Mann, 1981; Storey y Keyhani, 1974; Takei y col., 1984); los fosfolípidos no sirven como substrato celular directo para su oxidación por la mitocondria, deben ser hidrolizados a ácidos grasos libres y después convertidos a ésteres de carnitina, los cuales sí son substratos directos para la beta-oxidación

mitocondrial (Storey y Keyhani, 1974).

El glucógeno está en muy bajas concentraciones, o no existe en los espermatozoides, y no hay evidencias de que contengan una vía gluconeogénica activa; la glucosa es utilizada preferentemente como sustrato, aunque en plasma seminal la fuente de energía exógena primaria, que utilizan, sea la fructosa (Mann y Lutwak-Mann, 1981).

Los espermatozoides de mamífero también utilizan una variedad de aminoácidos para la producción de energía; oxidativamente los desaminan; y contienen actividad de transaminasa; la oxidación de aminoácidos parece ser limitada y no se acompaña de aumento substancial en la velocidad respiratoria.

En el espermatozoide maduro, las vías metabólicas biosintéticas están esencialmente ausentes aunque se ha comunicado la incorporación, relativamente baja, de aminoácidos marcados a proteínas mitocondriales (Preckumar y Bhargava, 1972; Mújica, 1979); así mismo, se ha señalado la síntesis de RNA y la actividad de RNA-polimerasa, tanto en la región nuclear como en la mitocondrial (Garbers y Kopf, 1980). El ATP espermático es sintetizado como en otras células, y se utiliza principalmente para el transporte de iones y la movilidad celular (Mann y Lutwak-Mann, 1981).

En presencia de sustratos exógenos, la respiración de los espermatozoides de mamífero puede ser estimulada por inhibidores de fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos, AMPc exógeno, o

dibutiril-AMPC (Garbers y col., 1971; Hicks y col., 1972; Li, 1972). Las concentraciones de ATP disminuyen marcadamente en respuesta a las metilxantinas o AMPc exógeno (Garbers y col., 1971; Frenkel y col., 1973). Así mismo, los inhibidores de fosfodiesterasas, el AMPc o sus análogos estimulan la glucólisis espermática (Frenkel y col., 1973; Hoskins y col., 1973).

Hasta ahora, no se ha aclarado si esta estimulación del metabolismo espermático es debida a la estimulación primaria de la movilidad a la estimulación directa de la actividad de las enzimas metabólicas, o bien a un efecto dual del AMPc, estimulando tanto metabolismo como movilidad, en forma directa o independiente.

Los datos obtenidos por diferentes laboratorios sugieren que el AMPc no estimula el metabolismo espermático endógeno de lípidos (Garbers y col., 1971; Garbers y Kopf, 1980).

La capacitación espermática.

Ver antecedentes específicos.

La reacción acrosomal.

Cornett y Meizel (1977, 1978) encontraron que los agonistas alfa- y beta-adrenérgicos (catecolaminas) estimulan la reacción acrosomal de los espermatozoides de hámster, así como su habilidad fertilizante. Aunque no se ha comunicado que los agonistas alfa- y beta-adrenérgicos tengan algún efecto en las concentraciones de AMPc espermático (Garbers y Kopf, 1980; Clegg, 1983); Mrsny y Meizel (1979, 1980) reprodujeron los efectos de las catecolaminas

utilizando teofilina y dibutiril-AMPC.

También se ha comunicado que el 8-Br-AMPC y otros inhibidores de fosfodiesterasas aceleran la capacitación y/o la aparición de la reacción acrosomal de los espermatozoides de cuyo (Hyne y Garbers, 1979). En contraste, Rogers y García (1979) mostraron que el dibutiril-AMPC y varias metilxantinas inhiben la reacción acrosomal de los espermatozoides de cuyo y de hámster. Fraser (1981) encontró que el dibutiril-AMPC por sí solo, en concentraciones milimolares, no aumenta la pérdida del acrosoma de los espermatozoides de ratón, pero que sí es requerido para que ésta se presente.

Por otra parte, Mrsny y Meizel (1980) encontraron que cantidades micromolares de dibutiril-AMPC estimulaban la pérdida del acrosoma y alteraban el patrón de movilidad de los espermatozoides de hámster. Parece ser que el AMPC sólo no induce la reacción acrosomal, ya que al adicionar 8-Br-AMPC a espermatozoides capacitados, en un medio sin  $\text{Ca}^{+2}$ , éstos no sufren la reacción acrosomal (Hyne y Garbers, 1979). Esto sugiere que el AMPC, bajo condiciones determinadas, puede interrelacionarse con el metabolismo, el  $\text{Ca}^{+2}$  y la reacción acrosomal (Garbers y Kopf, 1980).

Los mecanismos específicos por los cuales el AMPC podría participar en la estimulación de la reacción acrosomal aun no se han esclarecido; Meizel (1978) sugiere que algunas enzimas tipo proteasa, fosfatasa y fosfolipasa podrían ser modificadas en forma importante para la inducción de la reacción acrosomal. La polimerización de

la actina y la formación de microfilamentos también se sugiere que sean sitios potenciales de acción del AMPc; Peterson y col., (1978) describieron la formación de microfilamentos, inducida por el dibutiril-AMPc y el  $\text{Ca}^{+2}$ , en el área acrosomal del espermatozoide del cerdo; por otra parte, Stambaugh y Smith (1978) observaron elementos similares en la membrana acrosomal de los espermatozoides de conejo y mono.

## ANTECEDENTES ESPECIFICOS

*El AMPc y la capacitación espermática*

Se ha descrito que ocurre un incremento en la respiración, la glucólisis y la movilidad durante el período de capacitación de los espermatozoides. También se ha comunicado que los nucleótidos cíclicos y los inhibidores de la PD, inducen efectos estimulantes en los mismos procesos. De esto se ha sugerido la participación de los nucleótidos cíclicos en el proceso de la capacitación (Rogers y col., 1971; Hicks y col., 1972; Hoskins, 1973; Hoskins y col., 1975).

Por otra parte, sólo los espermatozoides que han sufrido la RA son capaces de fertilizar al óvulo, y sólo los espermatozoides capacitados pueden sufrir la RA. A su vez, se ha encontrado un efecto positivo del AMPc sobre la presentación de la RA y la adquisición de la habilidad fertilizante de los espermatozoides de varias especies de mamíferos: cerdo, conejo, cuyo, hámster, humano, primate, rata, ratón, toro y otras (Rosado y col., 1974; Toyoda y Chang, 1974; Peterson y col., 1978, 1979; Fraser, 1979, 1981; Hyne y Garbers, 1979; Mrsny y Meizel, 1980; Perreault y Rogers, 1982; Chan y col., 1983). En base a ello, los diversos investigadores, han sugerido que el efecto positivo del AMPc exógeno, sus análogos (Dibutiril-AMPc, 8-Br-AMPc) y de los inhibidores de la PD, sobre los eventos señalados, puede deberse a que se disminuye el tiempo

requerido por los gametos para su capacitación.

Sin embargo, en la literatura encontramos resultados contradictorios. Así, Rogers y García (1979) muestran que si al medio de incubación de los espermatozoides se les añade dibutiril-AMPC o un inhibidor de PD, la presentación de la RA y la adquisición de la habilidad fertilizante se inhiben, tanto en los espermatozoides de cuyo como en los de hámster, y sugirieron que el AMPC podría estar inhibiendo la capacitación espermática. Así mismo, Rogers y García (1979) encontraron que por la presencia de imidazol (activador de PD) en el medio de incubación, la proporción de los espermatozoides que sufren la RA es aumentada significativamente; y, sugirieron que la reducción del nivel de AMPC intraespermático podría ser una parte de los mecanismos de la capacitación, de la RA o de ambas.

Los datos que señalan, en una forma un tanto más directa, la posible participación del AMPC en el proceso de capacitación son los de Morton y Albagli (1973), Berger y Clegg (1977, 1983) y los de Stein y Fraser (1984), quienes trabajando con espermatozoides de hámster, cerdo y ratón (respectivamente), encontraron que: bajo condiciones tanto *in vivo* como *in vitro*, que producen espermatozoides capacitados; la actividad de la adenilato ciclasa se incrementa, lo que sugiere que existe una mayor disponibilidad de AMPC durante la capacitación.

Para valorar la función del AMPC en la capacitación espermática, la técnica más utilizada ha sido la de adicionar AMPC, análogos de

éste más permeables, o bien inhibidores de PD, al medio de incubación de los gametos y después determinar algún parámetro indicativo de la capacitación de los mismos, como la RA o la fertilización. Sólo algunos autores han determinado los niveles de AMPc intraspermático, durante la capacitación (Cascieri y col., 1976; Hyne y Garbers, 1979; Perreault y Rogers, 1982; Stein y Fraser, 1984), de ellos Hyne y Garbers (1979) y Moreno (1985) han sido los únicos autores, que encontramos, que lo han hecho en los espermatozoides de cuyo.

Hyne y Garbers (1979) observaron un incremento substancial y transitorio de los niveles intracelulares del nucleótido cíclico, dentro de los primeros 30 seg de iniciada la incubación de los gametos en un medio con  $\text{Ca}^{+2}$ . Mientras que, en ausencia del catión divalente, el contenido de AMPc sólo se incrementó en baja proporción al tiempo señalado. En el trabajo de Hyne y Garbers (1979) se puede notar que aun cuando se presenta una elevación del contenido intracelular de AMPc, a los 30 seg de incubación de los espermatozoides en el medio mínimo de cultivo, los gametos requirieron de 1.0 a 1.5 horas para capacitarse en presencia de  $\text{Ca}^{+2}$ , mientras que en su ausencia, con una menor elevación inicial del nivel intraspermático de AMPc, sólo requirieron de 0.5 a 1.0 horas. Sin embargo, cuando al medio de incubación sin  $\text{Ca}^{+2}$  le añadieron 1-metil-3-isobutilxantina u 8-Br-AMPc, se redujo considerablemente el tiempo de capacitación. Los autores basados en los últimos resultados

sugirieron que el AMPc tenía un efecto estimulante sobre el proceso de capacitación espermática. Hay que señalar que bajo estas últimas condiciones de incubación, los espermatozoides estuvieron bajo condiciones que, probablemente, mantuvieron un nivel elevado de AMPc durante más tiempo, situación que no parece ocurrir en condiciones normales (Perreault y Rogers, 1982; Stein y Fraser, 1984).

Por otra parte, en nuestro laboratorio se han obtenido datos preliminares en los que se observa que los espermatozoides de cuyo preincubados durante períodos cortos (5 min), en el medio de Tyrode; cuya composición es semejante a la del medio de Biggers, uno de los medios utilizados por Hyne y Garbers (1979); expresan la RA al ser transferidos al medio MCM, lo que sugiere que estos gametos se capacitan en ese período de preincubación. Mientras que los gametos preincubados, durante el mismo período de tiempo, en MCM, no expresan la RA, dentro de los primeros 15 min de ser transferidos al medio MCM.

Hyne y Garbers (1979) concluyeron que el tiempo de capacitación de los espermatozoides de cuyo no dependía del nivel de AMPc alcanzado al inicio de su incubación. Dado que los espermatozoides incubados en el medio de Biggers -que incrementaron su contenido de AMPc (dentro de los primeros 30 seg) dos veces más, que cuando fueron incubados en MCM, expresaban la RA hasta después de 8 horas de iniciada la incubación, mientras que en el medio MCM la expresaban después de una hora de incubación.

La aparición tardía de la RA de los gametos incubados en el medio de Biggers, podría atribuirse al efecto propuesto para la glucosa (Mújica y Valdes, 1983), sobre la inhibición de la expresión de RA en los espermatozoides capacitados. Mújica y Valdes, (1983), muestran que los espermatozoides de cuyo se capacitan en el medio de Tyrode, adicionado de glucosa, en sólo 90 min de incubación. Tomando estos datos en conjunto, consideramos que las condiciones utilizadas por Hyne y Garbers (1979), para analizar la capacitación espermática, pudieron no ser las adecuadas.

Moreno (1985) determinó que el contenido de AMPc intracelular, se eleva transitoriamente al inicio de la incubación (30 seg) de los espermatozoides de cuyo en el medio MCM; dato que concuerda con las observaciones de Hyne y Garbers (1979). Además, encontró que por la presencia de glucosa en el medio de incubación, los espermatozoides producen un nivel de AMPc significativamente mayor, que el observado en los espermatozoides incubados en el medio sin el carbohidrato. Así mismo, observó que el contenido de AMPc intraespermático cae a un nivel cercano al basal y permanece esencialmente constante durante los siguientes 30 min de incubación, tanto en el medio MCM solo como en el MCM adicionado de glucosa.

Concretando: La glucosa induce un incremento inicial de AMPc intraespermático mayor (Moreno, 1985); el medio de Tyrode adicionado de glucosa es un medio óptimo para la capacitación temprana de los espermatozoides de cuyo (Mújica y Valdes, 1983); por otra parte, a

excepción del incremento de AMPc al inicio de la incubación capacitante (Hyne y Garbers, 1979; Moreno, 1985), la concentración de AMPc intraespermático permanece esencialmente constante durante el período de la capacitación (Hyne y Garbers, 1979; Perreault y Rogers, 1982; Stein y Fraser, 1984; Moreno, 1985).

Las observaciones que citamos podrían sugerir que el contenido inicial de AMPc de los espermatozoides influye en la duración de la capacitación de los mismos; a su vez nos permiten plantearnos el objetivo del presente trabajo.

## OBJETIVO

Determinar si existe alguna relación entre el contenido de AMPc intraespermático, que se alcanza al inicio de la incubación y la capacitación del espermatozoide de cuyo.

Para llevar a cabo éste, se fijaron los siguientes objetivos particulares:

1. Determinar el contenido basal de AMPc de los espermatozoides de cuyo
2. Determinar el contenido de AMPc intracelular al inicio de la incubación de los gametos en los medios capacitantes seleccionados
3. Incubar a los espermatozoides en varios medios definidos, durante 5 min y transferir inmediatamente después al medio mínimo de cultivo, para valorar la expresión de la reacción acrosomal como criterio indicativo de la capacitación
4. Relacionar el contenido de AMPc intraespermático, encontrado al inicio de la incubación, con el tiempo de capacitación y el comportamiento de los espermatozoides

## MATERIAL Y METODOS

### *Reactivos*

Los reactivos utilizados en el presente trabajo que se describen a continuación fueron de grado analítico y se obtuvieron de las casas comerciales que se indican: acetona, citrato de sodio, dextrosa, formaldehído, sal disódica del ácido etilendiaminotracético (EDTA),  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{HCl}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e  $\text{NaOH}$  de J.T. Baker de México; ácido láctico, bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB), 2-desoxi-D-glucosa, 6,7-dimetoxi-veratrilisoquinolina (papaverina), DL-ditiotreitol (DTT), imidazol, piruvato de sodio, trizma-base y trizma-HCl, de Sigma Chemical Co., U.S.A.; lauril sulfato de sodio (SDS), de BDH Chemical Ltd., England; Triton X-100, de BDH Chemical Ltd., U.S.A.; pentobarbital sódico (Anestesal), de Smith Kline de México; sacarosa, de Schwarz/Mann, U.S.A.; bromuro de Cellex-T de Bio-Rad Lab., U.S.A.; juego de reactivos para la determinación de AMP cíclico, de Amersham International, Plc., U.K.; Insta Gel, de United Technologies Packard, U.S.A.

### *Medios de incubación*

Los medios base de incubación que fueron utilizados en el presente trabajo se muestran en la tabla 1.

En los experimentos diseñados para inducir niveles bajos de AMPc intraespermáticos, se utilizó el medio de incubación MCM

(base) adicionado de: sacarosa (210.16 mM y 204.60 mM), para ,  
substituir al NaCl, en MCM-base y en MCM-glucosa, respectivamente;  
(Moreno, 1985); imidazol (7.0 mM) (Rogers y García, 1979); citrato  
de sodio (10.0 mM) (Haesungcharerm y Chulavatnatol, 1978); o,  
2-desoxi-D-glucosa (5.56 mM) (Mújica y Moreno, comunicación  
personal),

TABLA 1  
 MEDIOS DE INCUBACION

Medio	Referencia	Composición*
NaCl-NaHCO <sub>3</sub>	Moreno (1985)	NaCl, 128.93; NaHCO <sub>3</sub> , 25.07
NaCl-NaHCO <sub>3</sub> -EDTA	-	NaCl, 128.93; NaHCO <sub>3</sub> , 25.07; EDTA, 0.0123
MCM	Barros (1974)	NaCl, 105.08; CaCl <sub>2</sub> , 1.71; NaHCO <sub>3</sub> , 25.07; piruvato de sodio 0.25; ácido láctico, 20.0
TYRODE	Rogers y Yanagimachi (1975)	NaCl, 122.29; KCl, 2.8; CaCl <sub>2</sub> , 1.8; NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0.36; MgCl <sub>2</sub> , 0.49; NaHCO <sub>3</sub> , 11.9; piruvato de sodio, 0.25; ácido láctico, 20.0

\*La concentración de los componentes esta dada en mM. El pH de los medios se ajustó, con NaOH y HCl 2.0 M, a 7.8; el del Tyrode a 7.6

\*\*Todos los medios de incubación se ensayaron solos y adicionados de glucosa (5.58 mM) y/o papaverina (5.0 µM). Para mantener la osmolaridad en ellos, el equivalente de la concentración de las especies iónicas adicionadas se restó de la concentración de NaCl

### *Obtención de los espermatozoides*

Las muestras espermáticas fueron obtenidas de los conductos deferentes de cuyos (*Cavia porcella*) adultos, en un peso no menor de 650 g. Cada cuyo fue anestesiado por la administración, vía intraperitoneal, de 50 mg de pentobarbital sódico por kg de peso. Ya anestesiados, se les rasuró la parte abdominal, desde la última costilla hasta la bolsa escrotálica; a continuación se les practicó una incisión cefalopodal, en la línea sagital, hasta alcanzar la cavidad visceral. Localizados los testículos, se procedió a eliminar los ligamentos que los mantienen unidos a la región púbica; cortando el músculo gubernaculum, que está unido a la cola del epidídimo, así como el músculo mesentérico y el cuerpo graso, en su porción más alejada del testículo, y extrayendo cada testículo, se logró descubrir completamente a los conductos deferentes. Uniendo ambos testículos, tensando los conductos deferentes y pinzándolos, se cortaron ambos conductos en la porción más próxima a su unión con la vesícula seminal. Cada conducto fue ligado por el lado proximal al extremo pinzado y enseguida fue colocado en solución salina fisiológica (NaCl 154 mM), mantenida a 37°C en un baño de agua. Posteriormente, se disecó cada conducto deferente, cuidando de no permitir ni su desecación ni su enfriamiento, dándoles baños espaciados en la solución salina fisiológica (37 °C). Una vez limpios, a cada conducto se le practicó una incisión, muy cerca del extremo ligado, por la cual se le introdujo una cánula; después de cortar el extremo opuesto del conducto, en la unión con la cabeza

del epidídimo. Los espermatozoides se expulsaron fuera del conducto por la inyección de 2 ml de solución de NaCl 154 mM (a 37 °C), por medio de la cánula; la suspensión espermática se colocó en un tubo de ensayo (de vidrio), previamente calentado a 37 °C en el baño de agua. Las muestras espermáticas se colocaron en el baño de agua a 37 °C y bajo atmósfera de aire hasta el lavado de los gametos.

#### *Lavado de los espermatozoides*

De las suspensiones espermáticas recién extraídas, se tomaron muestras alícuotas y se observaron al microscopio de luz (Carl Zeiss, Mod. Docuval; Germany), para seleccionar a aquellas utilizables para los ensayos. Solamente se estudiaron las muestras espermáticas que presentaron gametos con buena movilidad, formando empalizadas; y con un escaso número de espermatozoides muertos (con y sin acrosoma inmóviles), además de una contaminación baja por otro tipo de células (menos del 0.1%). Las muestras seleccionadas se centrifugaron a 600 x g durante 4 min (ROTO-UNI II, Ultracom), a temperatura ambiente. Se les retiró el líquido sobrenadante y, a la pastilla celular de cada conducto se le resuspendió en 1 ml de solución salina a 37 °C. Todas las suspensiones espermáticas se mezclaron. La suspensión celular resultante se centrifugó nuevamente, en las condiciones arriba señaladas. Se desechó el sobrenadante y, la pastilla celular fue resuspendida utilizando 1 ml de solución salina a 37 °C por espermatozoides provenientes de cada conducto deferente utilizado. De esta suspensión se tomó una

muestra alícuota para determinar su concentración espermática, como se describe a continuación.

#### *Determinación de la concentración espermática*

Para determinar la concentración de espermatozoides, se tomó una muestra alícuota de 50  $\mu$ l de la suspensión de gametos lavados y se diluyó 21 veces en una solución de Triton X-100 al 0.1% en PBS (PBS:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 5.68 mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4.26 mM; NaCl, 132.44 mM). La suspensión resultante se mezcló utilizando un vórtex (Lab-Line Instruments Inc., U.S.A.). El número de espermatozoides se determinó utilizando una cámara Neubauer. La concentración espermática, en la suspensión celular original, se valoró por medio de la relación:

$$\frac{N \times D \times 1000}{H} = \text{ECM}$$

donde:

N = número de espermatozoides en 0.1  $\text{mm}^3$  de la cámara de Neubauer

D = dilución de la muestra (21)

H = altura de la cámara de Neubauer (0,1 mm)

ECM = número de espermatozoides en 1.0  $\text{cm}^3$

#### *Incubación de los espermatozoides*

La suspensión de espermatozoides lavados se fraccionó en tubos de ensayo (de vidrio) precalentados a 37 °C. El volumen de las

fracciones varió de 1.0 a 2.0 ml, dependiendo del número de espermatozoides obtenidos en la muestra total y de las condiciones de cada experimento en particular. Cada fracción de suspensión espermática se centrifugó a  $600 \times g$  durante 4 min, a temperatura ambiente. Los sobrenadantes fueron desechados y, cada pastilla espermática fue resuspendida en el medio de incubación apropiado (según el experimento a realizar), en un volumen suficiente para obtener una concentración final de  $35 \times 10^6$  células por ml de medio de incubación. La incubación de los gametos se realizó en baño de agua a  $37^\circ C$  y bajo atmósfera de aire. A los 15 y 30 seg de iniciada la incubación se tomaron muestras alícuotas, de cada suspensión espermática, para determinar el contenido de AMPc intracelular, como se indicará posteriormente. A diversos tiempos de incubación se observaron al microscopio de luz (de 80 a 300 X) pequeñas muestras alícuotas, para valorar el comportamiento y viabilidad de los gametos incubados.

#### *Valoración de la capacitación y la reacción acrosomal espermáticas*

Para determinar si los espermatozoides incubados en un medio dado se capacitaban en un período de 5, 30 y 60 min. muestras alícuotas de 0.3 a 0.5 ml de cada una de las suspensiones espermáticas incubadas se tomaron a los tiempos señalados, para valorar la capacitación por la presentación de la RA (Mújica y Valdés, 1983). Para ello cada muestra alícuota fue centrifugada a  $600 \times g$  durante 4 min a temperatura ambiente y, el sobrenadante de cada muestra fue

substituido por un volumen similar de medio de incubación MCM (a 37 °C). Al proceso de substituir el medio de incubación original de cada muestra espermática por MCM fresco, se le denominó como "transferencia" y, a las muestras así tratadas se denominaron como "muestras transferidas". Los espermatozoides resuspendidos en MCM fueron regresados inmediatamente al baño de agua a 37 °C. La presentación de la RA se valoró dentro de los primeros 15 min de iniciada la transferencia de los gametos.

La RA se valoró tanto cualitativa como cuantitativamente. La determinación cualitativa se realizó por observación al microscopio de luz, en pequeñas muestras alícuotas, la presencia de espermatozoides sin acrosoma, muy activos en su movimiento y con una agitación vigorosa, en forma de látigo, de su flagelo (Yanagimachi y Usui, 1974). La valoración cuantitativa de la RA se realizó determinando el porcentaje de espermatozoides carentes de acrosoma, en muestras alícuotas de 50 µl fijadas en formaldehído al 3.0% en PBS, tanto al inicio de la transferencia a MCM ( $t_0$ ) como a los 15 min de transcurrida ( $t_{15}$ ). El porcentaje de RA de cada muestra fijada se determinó por el conteo de no menos de 200 gametos, en una cámara de Neubauer, utilizando la relación:

$$\% RA = \frac{ESA}{NTE} \times 100$$

donde: % RA = por ciento de reacción acrosomal, de cada muestra fijada ( $t_0$  ó  $t_{15}$ )

ESA = número de espermatozoides sin acrosoma

NTE = número total de espermatozoides contados

El porcentaje de RA de cada muestra experimental correspondió a la diferencia:

$$\% RA_{t_{15}} - \% RA_{t_0}$$

*Determinación de contenido de AMPc intraespermático*

Para valorar el contenido de AMPc intracelular alcanzado por los espermatozoides al inicio de la incubación, se extrajeron muestras alícuotas de 0.9 ml, de cada suspensión espermática, a los 15 y 30 seg de iniciada la incubación en los diferentes medios ensayados. Cada muestra extraída se colectó en un microtubo de ensayo Eppendorf (Brinkman Instruments, Inc., U.S.A.), y a los tiempos señalados se congeló en un baño de hielo seco-acetona (-70°C). A cada muestra congelada se le añadieron 0.1 ml de un amortiguador compuesto por trizma 200 mM-EDTA 40 mM, pH 7.6. Para liberar el contenido intracelular de los gametos congelados, las muestras fueron sometidas a cinco ciclos de congelamiento-descongelamiento, rápidos, utilizando el baño de hielo seco-acetona y un baño de agua a ebullición, respectivamente. Las suspensiones resultantes fueron centrifugadas a 12 000 x g en una microcentrífuga (Centrifuge 5412, mod. Eppendorf; Eppendorf Gerätebau Netheler + Hinz GmbH, W.G.), durante 10 min, a temperatura ambiente. Del sobrenadante de cada muestra se retiraron 0.9 ml y se colocaron en un microtubo de ensayo Eppendorf que fue congelado en el baño de hielo seco-acetona;

estas muestras fueron liofilizadas (liofilizadora Virtis, The Virtis Co., Inc., U.S.A.), y se almacenaron a 4 °C hasta determinar su contenido de AMPc. La pastilla celular se procesó, como se indicará después, para cuantificar el número de espermatozoides por su absorbancia a 260 nm.

Las muestras liofilizadas se reconstituyeron con 200 µl de un amortiguador compuesto por trizma 20 mM-EDTA 4 mM, pH 7.6, en el mismo microtubo de ensayo. Las muestras control (medio de incubación sin células) se procesaron de la misma manera. El AMPc se cuantificó por duplicado, en 50 µl de cada muestra reconstituida, utilizando el sistema de análisis de Amersham, modificado por Pollard y Weingrand (1976), para AMPc en extractos crudos. Este sistema de análisis se basa en la competencia entre AMPc no marcado (de la muestra analizada o de un estándar externo) y una cantidad fija del mismo compuesto marcado con tritio ([8-<sup>3</sup>H] adenosín 3,5-monofosfato cíclico), para unirse a una proteína, la cual tiene una elevada especificidad y afinidad por el AMPc. La cantidad formada del complejo proteína-(8-<sup>3</sup>H)AMPc es inversa a la cantidad de AMPc no marcado presente en la muestra analizada. Este sistema de análisis para cuantificar al AMPc proporciona una curva de calibración lineal, con un límite mínimo de detección de 0.05 picomolas de AMPc, y es útil para cuantificar AMPc en un rango de 0.2 a 16.0 picomolas por muestra (4 a 320 pmol/ml de extracto analizado).

El sistema de análisis para AMPc de Amersham involucra la separación del complejo proteína-AMPc (marcado o no), del nucleo-

tido no unido (marcado o no), por medio de la adsorción del nucleótido libre en carbón activado, seguido de centrifugación y recuperación del sobrenadante. Pollard y Weingrand (1976) modificaron este paso, substituyéndolo por una cromatografía en bromuro de Cellex-T.

El procedimiento general de la determinación es como sigue. De cada muestra reconstituida se tomaron 50  $\mu$ l, por duplicado, y se colocaron en microtubos de ensayo Eppendorf, en un baño de hielo-agua (0 °C). A cada muestra se le agregaron 50  $\mu$ l de (8-<sup>3</sup>H)AMPc (0.50  $\mu$ Ci), más 100  $\mu$ l de proteína enlazante de AMPc. La mezcla se homogeneizó durante 10 seg en un vórtex y se mantuvo a 4 °C (sin sacarse del baño de hielo-agua), durante dos horas. Una vez alcanzado el equilibrio de la reacción, se le agregaron 300  $\mu$ l de una suspensión de bromuro de Cellex-T al 2% (p/v) en trizma 10 mM, pH 7.4, a cada una de las mezclas de reacción, y se dejó incubar durante 5 min en el mismo baño de hielo-agua para proceder a realizar la separación del AMPc marcado, por medio de una columna de afinidad. El contenido de cada microtubo de ensayo se transfirió a una columna de vidrio (de 19 cm de largo y 0.5 cm de radio; taller CINVESTAV-IPN), la cual contenía un tapón de fibra de vidrio (Owens-Corning Fiberglass Co., U.S.A.), en su extremo inferior, la transferencia de la muestra a la columna se realizó cuantitativamente mediante el lavado del microtubo de ensayo con cinco volúmenes de 1 ml de solución de trizma 10 mM, pH 7.4, cada vez. Este proceso a su vez permitió el lavado de la columna con la consiguiente eliminación de parte del nucleótido no unido a la proteína retenida en la resina. Para eliminar todo el nucleótido

libre se lavó la columna con 5 ml más del amortiguador de trizma 10 mM, pH 7.4. Los eluatos de los lavados se colectaron en viales para su eliminación. El (8-<sup>3</sup>H)AMPc formando complejo con la proteína, retenido en la columna, se eluyó con 3 ml de solución de SDS al 1% (p/v) en agua bidestilada; los eluatos se recolectaron en viales limpios. A cada eluato se le adicionaron 10 ml de Insta Gel y se homogeneizó perfectamente la mezcla con la ayuda de un vórtex. La cantidad de cuentas por minuto (cpm) de cada muestra se determinó en un contador de centelleo líquido (TRI-CARB 460C, Liquid Scintillation System; Packard Instruments, Inc., U.S.A.). Cada muestra fue contada dos veces durante 4 min.

En cada determinación se incluyó una curva patrón de calibración (Fig. 4), trazada de la siguiente manera. De un estándar de AMPc (1600 pmol/ml), se hicieron diluciones en 0.5 ml de trizma 20 mM-EDTA 4 mM, pH 7.6, para obtener las siguientes concentraciones de AMPc estándar: 0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 y 16.0 pmol/50 µl. De cada dilución se tomaron 50 µl (por duplicado) y se procesaron como si fueran una muestra común experimental.

Los cálculos se realizaron de la siguiente manera:

- a. Se determinó el valor promedio de las cuentas por minuto (cpm) de cada pareja de muestras
- b. Se restó el valor promedio de cpm del blanco (50 µl de (8-<sup>3</sup>H)AMPc; 150 µl de trizma 20 mM-EDTA 4 mM, pH 7.6; 300 µl de bromuro de Cellex-T al 2% (p/v) en trizma 10 mM, pH 7.4; y procesado normalmente), a cada valor promedio

de las muestras tanto para determinar, así el valor real del promedio de cpm de las muestras, correspondientes a la curva patrón, como de las problema experimentales. Aquí, definimos  $C_0$  como el punto de la curva en el cual se eliminó el AMPc estándar (obteniéndose con ello, el valor, en cpm, de la unión máxima de  $(8-^3\text{H})\text{AMPc}$  con la proteína, ya que no compete con el AMPc sin marca); y a  $C_x$  como el valor de cpm obtenido en cualquier muestra experimental incluyendo los puntos de la curva patrón.

- c. Se calculó el valor de la relación  $C_0/C_x$ , para cada concentración de AMPc estándar y para las muestras analizadas.
- d. Se trazó la curva patrón, graficando la concentración de AMPc estándar en el eje de las abscisas, y el valor de la relación  $C_0/C_x$  en el eje de las ordenadas.
- e. Interpolando el valor de  $C_0/C_x$ , de cada muestra analizada, en la curva patrón se determinó la concentración de AMPc en los 50  $\mu\text{l}$  de muestra que se analizaron.
- f. El contenido de AMPc en la muestra total (0.9 ml) se determinó al multiplicar el valor obtenido en (e.) los 50  $\mu\text{l}$  de muestra por la dilución (40/9) de la muestra espermática analizada.
- g. Se relacionó la cantidad de AMPc de cada muestra analizada con el número de espermatozoides de la misma y se expresó como: pmoles de AMPc en  $1 \times 10^7$  espermatozoides.

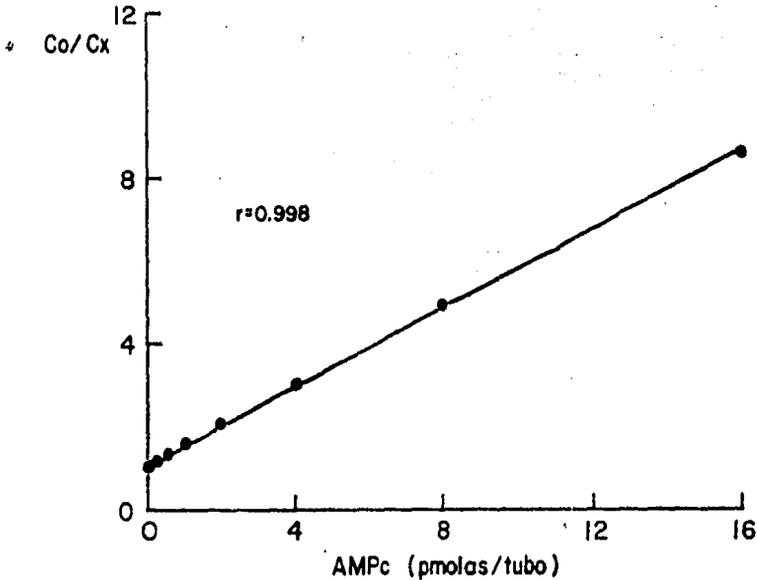


Fig. 4. Curva estándar, representativa, de la determinación de AMP cíclico. La valoración del contenido de AMPc de una muestra dada, se basa, en la competencia entre una cantidad fija (16 picomolas/ml, con 0,5  $\mu$ Ci) de AMPc-(8- $H^3$ ) y cantidades conocidas de AMPc (0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 y 16 picomolas/tubo, denominadas Cx), por unirse a una proteína de alta afinidad por el nucleótido. El valor de Co indica la unión máxima que tiene la proteína con el AMPc-(8- $H^3$ ) en ausencia de AMPc sin marca.

Los datos mostrados en resultados indican, el valor promedio de las determinaciones de AMPc intraespermático realizadas a 15 y 30 seg de iniciada la incubación de los gametos, en los medios señalados.

*Cuantificación del número de espermatozoides por su absorbancia a 260 nm*

Para cuantificar el número de espermatozoides de las muestras en las cuales se determinó el contenido de AMPc intracelular, se siguió la metodología de Mújica y Moreno (en preparación), basada en la cuantificación de la absorbancia a 260 nm de las muestras espermáticas, solubilizadas diferencialmente por el método de Hernández-Montes y col., (1973).

El procedimiento general es como sigue:

La pastilla celular obtenida de cada muestra procesada para determinar el contenido de AMPc intraespermático (como se indicó anteriormente), se disgregó utilizando una varilla de vidrio. A continuación se le agregaron 100  $\mu$ l de una solución de DTT 9 mM en trizma 50 mM, pH 9. Cada muestra se mezcló con la ayuda de la varilla de vidrio, la cual al momento de su retiro se lavó con 100  $\mu$ l más de la misma solución de DTT, sobre la muestra. Después de 20 min, a cada muestra se le adicionaron 100  $\mu$ l de una solución de CTAB al 5% (p/v) en agua bidestilada, la mezcla resultante se homogeneizó con ayuda de un vórtex. Después de dejar actuar al CTAB por un período de 15 min, cada muestra fue centrifugada a

15 000 x g durante 10 min. Se desecharon 200  $\mu$ l del sobrenadante de cada muestra y, a la fracción restante se le adicionaron 200  $\mu$ l de una solución de SDS al 10% (p/v) en agua bidestilada, y 200  $\mu$ l de agua bidestilada; después de ésto, cada muestra fue sonicada durante 1 min a 8 watts (Sonifier Cell Disruptor B-30; Bronson Sonic Power Co., U.S.A.). De cada muestra sonicada se tomaron 0.4 ml y se mezclaron con 1.6 ml de PBS utilizando un vórtex. Se determinó la absorbancia a 260 nm (Spectrophotometer Gilford 250; Gilford Instruments Lab. Inc., U.S.A.), de cada muestra.

Para determinar el número de espermatozoides, de cada muestra analizada; el valor de su absorbancia a 260 nm se multiplicó por dos (dilución realizada), y el valor resultante se interpoló, por medio de la ecuación de una función lineal ( $y = mX + a$ ), en la curva patrón obtenida por R.A. Moreno (1985) Fig. 5.

#### *Parámetros estadísticos*

Los resultados obtenidos fueron sometidos a la prueba de "t" de Student para datos no pareados (Spiegel, 1961); se utilizó la prueba de una cola para darle el valor a la significancia de los resultados. En la determinación del contenido de AMPc intraespermático, la curva patrón se sometió a la prueba de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados (Spiegel, 1961). Los resultados expresan el valor de la media aritmética  $\pm$  la desviación estándar y, entre paréntesis, el número de experimentos realizados.

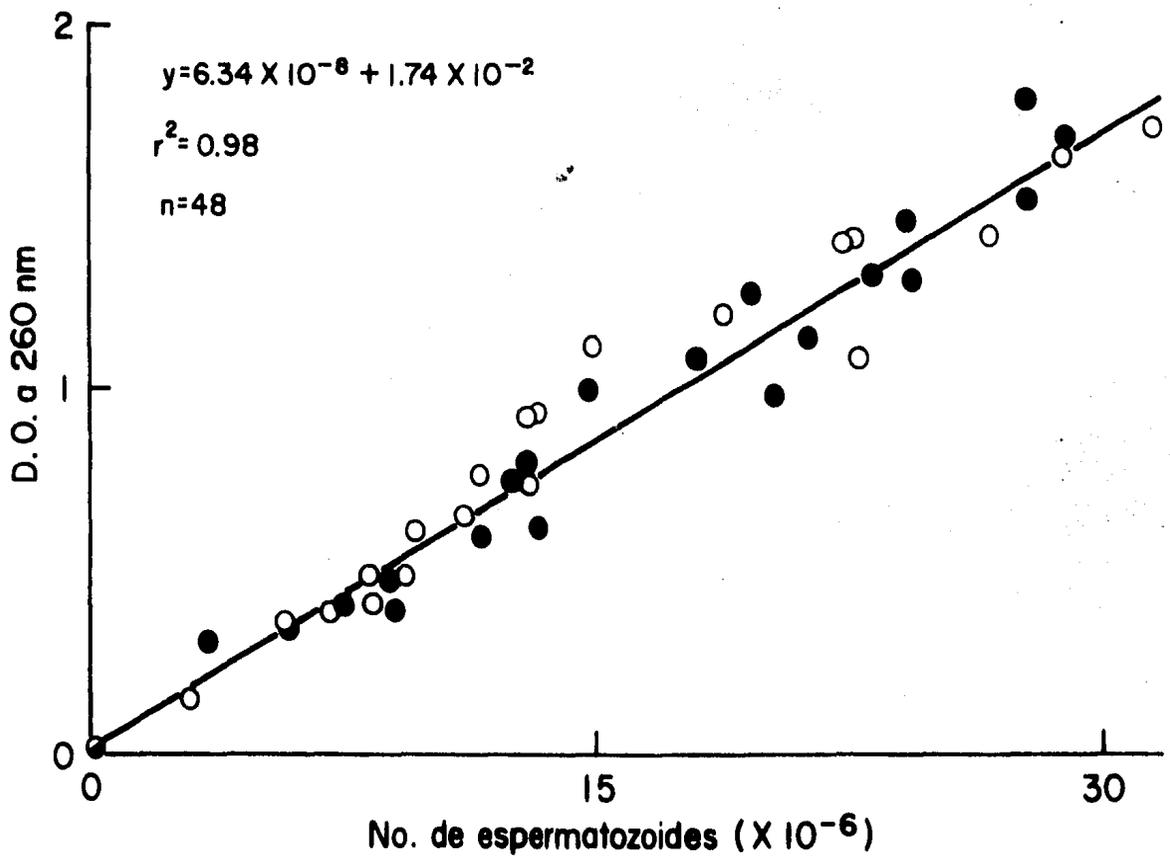


Fig. 5. *Correlación entre la concentración de núcleos espermáticos y su absorbancia a 260 nm.* Los espermatozoides lavados en NaCl (154 mM), fueron resuspendidos en MCM (○) o en MCM con glucosa (●) a una concentración de  $35 \times 10^6$  células por ml. De esta suspensión se tomaron volúmenes crecientes (de 0.1 a 0.9 ml) a los que se les añadieron 0.1 ml de trizma 200 mM-EDTA 40 mM, pH 7.4, y MCM o MCM con glucosa, suficiente para completar a 1 ml el volúmen final de cada muestra. De estas suspensiones se tomaron 50  $\mu$ l para valorar la concentración celular de cada muestra, por medio de la cámara Neubauer, que se muestra en el eje de las abscisas. La fracción remanente (0.9 ml) fue tratada con DTT-CTAB y los núcleos obtenidos fueron solubilizados en SDS y posteriormente se sonicaron. De la solución final se tomaron muestras alícuotas de 0.2 ml y se diluyeron con 0.8 ml de PBS, para determinar su absorbancia a 260 nm. La curva se trazó por el método de los mínimos cuadrados. El coeficiente de la recta obtenida fue de 0.98, de 48 muestras provenientes de 5 experimentos (Tomada de Moreno, 1985).

## RESULTADOS

*Contenido de AMPc en los espermatozoides recién obtenidos, en los lavados y en los incubados por un tiempo corto, en NaCl*

Los espermatozoides del cuyo extraídos de los conductos deferentes, lavados e incubados (37°C) en NaCl 154 mM, hasta por una hora, no se alteran de manera visible ni se capacitan (Valdés, 1981).

La solución de NaCl (154 mM) se utilizó como medio de incubación de los gametos, para determinarles su contenido basal de AMPc. La cuantificación del nucleótido se realizó: en los gametos recién obtenidos, en los lavados una y dos veces, así como, en los incubados a 37°C durante: 15, 30 y 60 seg y por 2 y 5 min.

La concentración de AMPc tendió a disminuir por efecto del lavado, así como durante los primeros 15 seg de iniciada la incubación de las células; pero, el AMPc se mantuvo a nivel más o menos estable, desde los 15 seg hasta los 5 min del inicio de la incubación. Este valor de AMPc se denominó "contenido basal" y no fue significativamente diferente del determinado en los gametos recién obtenidos, ni del de los espermatozoides lavados una o dos veces (tabla 2).

*Movilidad de los espermatozoides, durante su manejo en NaCl*

Los espermatozoides al ser extraídos con NaCl de los conductos deferentes, inician su movimiento, en forma paulatina, hasta alcanzar un nivel máximo en los primeros 5'. Posteriormente el

TABLA 2

Variación del contenido de AMP<sub>c</sub> intraespermático a partir de la extracción, el lavado y la incubación de las células en NaCl 154 mM

Condición de los espermatozoides	AMP <sub>c</sub> (picomolas/10 <sup>7</sup> espermatozoides)
Recién extraídos del epidídimo	4.41
Lavados (IX)	5.87
Lavados (2X)	3.83
Incubados**	
15"	2.69
30"	2.09
1'	1.88
2'	1.55
5'*	2.72 ± 1.23 (7)

\*Este valor se tomó como el contenido basal de AMP<sub>c</sub> intraespermático, se indica el valor de la media aritmética ± desviación estándar (número de experimentos)

\*\*Los gametos, extraídos y lavados (2X), se incubaron (37°C) en NaCl 154 mM, a una concentración de 35 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/ml. Se valoró el contenido intracelular de AMP<sub>c</sub> a los tiempos señalados.

movimiento disminuye con cada lavado, llegando a la inmovilidad total (en la población espermática completa) al cabo de 5-15 min de iniciada su incubación, o sea, 45-50 min a partir de la extracción. Los espermatozoides inmóviles permanecen en agrupaciones características, es decir, en empalizadas de más de 3 espermatozoides o bien éstas unidas cabeza a cabeza, formando pequeñas rosetas.

*Relación entre el contenido de AMPc intracelular y la capacitación espermática en MCM o en MCM-glucosa*

- a) Concentración de AMPc al inicio de la incubación de los espermatozoides. Los espermatozoides de cuyo, extraídos de los conductos deferentes y lavados, como se indica en Métodos, fueron incubados (37°C) en el medio MCM, o en MCM adicionado de glucosa 5.56 mM (MCMG). El contenido intracelular de AMPc aumentó, en forma significativa ( $p < 0.001$ ) con respecto al basal (Tablas 2 y 3), tanto a los 15 seg como a los 30 seg de iniciada la incubación en MCM, y en MCMG.

Los niveles intracelulares de AMPc, cuantificados en los espermatozoides al inicio de su incubación (15 y 30 seg) en el medio MCM, fueron significativamente menores ( $p < 0.05$ ), que los alcanzados por los gametos incubados en el medio MCM adicionado de glucosa (tabla 3). La presencia del carbohidrato en el medio de cultivo estimuló

aun más la síntesis de AMPc en el espermatozoide.

- b) Efecto de la incubación durante 5 min en el medio MCM y en MCMG sobre la capacitación espermática.

Los espermatozoides se incubaron por el tiempo y en los medios antes señalados y bajo las condiciones indicadas en Métodos. Al finalizar el período de incubación, las células se centrifugaron y se transfirieron a MCM, donde se valoró la R.A., tanto cualitativa como cuantitativamente, como medida de la capacitación espermática.

Se encontró que 5 min de incubación en MCM o en MCMG, fueron suficientes para que una pequeña proporción de la población espermática expresara la R.A., ésto es, la presencia de espermatozoides sin acrosoma y con movimiento activado dentro de los primeros 15 min de ser transferidos a MCM. La determinación cuantitativa del número de espermatozoides capacitados, valorada por el porcentaje de la población espermática que sufrió la R.A. ( $t_{15}-t_0$ ), no mostró diferencia significativa en la proporción de gametos que se capacitaron en uno u otro medio de incubación, a pesar de que el contenido intracelular de AMPc fue mayor en los espermatozoides incubados, en el medio con el carbohidrato.

- c) Efecto de la incubación en MCM y en MCMG sobre la movilidad espermática.

En cada experimento muestras alícuotas de las diferentes incubaciones espermáticas fueron retiradas a diferentes tiempos y observadas al microscopio para valorar el comportamiento de los gametos a lo largo de la incubación, que se prolongó hasta por un lapso de una hora.

Los espermatozoides incubados en MCM presentaron buena movilidad desde el inicio de la incubación, con una ondulación suave de su flagelo; de su agrupación inicial formando empalizadas de 3 o más espermatozoides, pasaron a formar rosetas y grumos de tamaño variable que gradualmente se disgregaron y, generalmente antes de una hora de incubación, el número de gametos nadando solos, con un movimiento flagelar muy activo (en forma semejante al movimiento de un látigo), con y sin acrosoma, era muy aparente, tal como lo describieron Yanagimachi y Usui (1974), en la presentación de la R.A. fisiológica o "verdadera". La presencia de la glucosa en el medio de incubación, cambió el movimiento ondulante del flagelo, de los espermatozoides incubados en MCM, a un movimiento frenético de vibración, que se mantuvo desde el inicio de la incubación y a lo largo de ella y aun lo conservaron los gametos transferidos al MCM. La glucosa también alteró ligeramente el patrón de agrupación celular, predominando las asociaciones espermáticas en forma de grumos de diferente

tamaño; así mismo, la presencia del carbohidrato inhibió la presentación de la R.A. en las muestras control (no transferidas a MCM).

- d) Efecto de la papaverina sobre la elevación de AMPc y sobre el comportamiento de los espermatozoides incubados en MCM y en MCMG.

En los resultados mostrados en la tabla 3 se puede observar que, la concentración intracelular de AMPc, que se alcanzó al inicio de la incubación de los espermatozoides de MCMG, en comparación con los niveles en MCM, no tuvo relación aparente con la proporción de gametos capacitados en 5 min de incubación. Por tal motivo, se decidió utilizar a un inhibidor de fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos, la papaverina, a una concentración final de 5  $\mu$ M, para tratar de dilucidar el posible efecto del AMPc intracelular sobre el tiempo de capacitación, al aumentar el nivel del nucleótido por retardo en su degradación.

El contenido intracelular de AMPc en los espermatozoides incubados en el medio MCM, se incrementó significativamente ( $p < 0.005$ ) por la presencia de la papaverina, dentro de los primeros 30 seg de iniciada la incubación; lo mismo ocurrió en los gametos incubados en MCM adicionado de glucosa y papaverina ( $p < 0.005$ ), en relación a sus respectivos controles. No obstante la amplificación del efecto del medio capacitante, en el nivel intracelular de

AMPC, inducida por la papaverina, la proporción de la población espermática que se capacitó en 5 min de incubación, tanto en MCM como en MCMG, no fue significativamente diferente de la proporción de espermatozoides capacitados en ausencia del inhibidor indicado; ya que, el número de gametos que expresaron la R.A. al ser transferidos al MCM, no fue significativamente diferente entre un nivel dado de AMPC intracelular y otro. Por otra parte, la presencia de la papaverina, en el medio sin o con glucosa, indujo una disminución en la movilidad espermática, la cual tendió a ser menor conforme se prolongaba la incubación, aunque la glucosa siguió induciendo un movimiento de vibración y siguió inhibiendo la presentación de la R.A.

*Relación entre el contenido de AMPC intracelular y la capacitación espermática en Tyrode o en Tyrode-glucosa*

- a) Concentración de AMPC al inicio de la incubación de los espermatozoides.

Los espermatozoides de cuyo extraído de los conductos deferentes y lavados como se indica en Métodos, e incubados a 37°C en el medio de Tyrode solo o adicionado de glucosa, incrementaron su contenido de AMPC intracelular de manera significativa ( $p < 0.001$ , para ambos medios), con respecto a su contenido basal (Tablas 2 y 4), dentro de los primeros 30 seg de iniciada su incubación.

TABLA 3

Relación entre el contenido inicial de AMP<sub>c</sub> intraespermático y el número de espermatozoides que se capacitan en 5 min de incubación en MCM como medio base

Medio de incubación*	AMP <sub>c</sub> ** (picomolas/10 <sup>7</sup> espermatozoides)	R.A.*** (%)
MCM	10.69 ± 3.60 (29)	13.6 ± 4.5 (28)
MCM-glucosa	18.54 ± 9.87 ( 8)	16.9 ± 9.9 ( 8)
MCM-papaverina	52.29 ± 11.91 ( 4)	14.6 ± 8.5 ( 4)
MCM-glucosa-papaverina	63.81 ± 26.77 ( 6)	12.8 ± 8.4 ( 6)

75

\*Los espermatozoides se incubaron a 37°C en los medios señalados, a una concentración de 35 x 10<sup>6</sup> células/ml. A concentración final de la glucosa fue de 5.56 mM, y la de la papaverina de 5 µM

\*\*La valoración del AMP<sub>c</sub> se realizó a los 15 y 30 seg de iniciada la incubación. Los valores mostrados en la tabla indican la media aritmética de las dos determinaciones ± la desviación estándar, (número de experimentos).

\*\*\*A los 5 min de iniciada la incubación de cada medio se tomaron muestras alícuotas, se centrifugaron y el paquete celular se resuspendió en MCM donde se valoró la R.A. como se indica en Métodos.

Los niveles intracelulares de AMPc que alcanzaron los espermatozoides incubados en el medio de Tyrode, al inicio de la incubación, no fueron significativamente diferentes de los niveles del nucleótido determinados en los gametos incubados en el medio de Tyrode, adicionado de glucosa (Tabla 4); no obstante, existió una tendencia a ser mayor el contenido intraespermático del nucleótido en los espermatozoides mantenidos en este último medio.

Por otra parte, el contenido intracelular de AMPc tendió a ser menor, aunque no significativamente diferente, en los espermatozoides incubados en el medio de Tyrode solo o adicionado de glucosa, que en los gametos incubados en MCM o en MCMG (Tablas 3 y 4).

- b) Efecto de la incubación durante 5 min en Tyrode y en Tyrode-glucosa, sobre la capacitación espermática.

Al cuantificar el número de espermatozoides capacitados en 5 min de incubación (como se describió en Métodos), valorando tanto cualitativa como cuantitativamente la presentación de la R.A. no se encontró diferencia significativa entre la proporción de espermatozoides que se capacitaron en el medio de Tyrode y en la encontrada en el medio Tyrode-glucosa (Tabla 4). Cabe hacer notar, que los niveles intracelulares de AMPc fueron muy similares en los espermatozoides incubados en ambos medios.

Por otra parte, el número de gametos capacitados en Tyrode solo o con glucosa, fue similar al determinado en MCM y MCMG, en períodos cortos de incubación.

- c) Efecto de la incubación en Tyrode y en Tyrode-glucosa sobre la movilidad espermática.

Desde el inicio de la incubación en el medio de Tyrode, los espermatozoides presentaron muy buena movilidad, con una ondulación de su flagelo más vigorosa que la descrita en MCM; la formación de rosetas y grumos de diverso tamaño (a partir de las empalizadas iniciales), fue ligeramente más rápida que en MCM. La presencia de espermatozoides sueltos durante la incubación en Tyrode, fue similar a la observada en MCM, mientras que en Tyrode-glucosa fue menor. La R.A. fisiológica, valorada cualitativamente, fue muy similar a la obtenida en MCM, en el medio de Tyrode, pero en presencia de glucosa fue inhibida como en MCMG; así mismo, la hexosa cambió el patrón, de movimiento y el de asociación de los gametos, siendo muy similar al señalado en MCMG.

- d) Efecto de la papaverina sobre la elevación de AMPc y sobre la capacitación de los espermatozoides incubados en Tyrode y en Tyrode-glucosa. La papaverina incrementó significativamente los niveles intracelulares de AMPc en los espermatozoides incubados en el medio de Tyrode, tanto en

ausencia ( $p < 0.05$ ), como en presencia de glucosa ( $p < 0.05$ ) (Tabla 4). La adición de la papaverina al medio de Tyrode hizo más evidente el efecto estimulatorio de la glucosa sobre la síntesis de AMPc en el espermatozoide. La proporción de la población espermática que se capacitó en 5 min de incubación en el medio de Tyrode solo o con glucosa, no fue significativamente diferente de la proporción capacitada en ambos medios adicionados de papaverina, no obstante el gran nivel de AMPc inducido en los gametos, sobre todo en presencia de la glucosa.

Al comparar el porcentaje de espermatozoides que presentó la R.A. por su incubación en Tyrode-papaverina y posterior transferencia a MCM, con el porcentaje determinado en los espermatozoides incubados en Tyrode-glucosa-papaverina (Tabla 4), se observa una mayor capacitación en este último medio, pero esto no es concluyente (dado el número de experimentos).

La papaverina indujo una menor movilidad de los gametos incubados en ambos medios; así mismo, indujo un patrón de agrupación en el que predominaron los grumos de tamaño variado, sin por ello alterar la expresión de la reacción acrosomal en los espermatozoides incubados en Tyrode; ni la movilidad característica inducida por la glucosa. Así mismo, no alteró el efecto de la glucosa en la expresión tardía de la R.A., en los espermatozoides no transferidos.

TABLA 4

Relación entre el contenido inicial de AMP<sub>c</sub> intraespermático y el número de espermatozoides que se capacitan en 5 min de incubación en tyrode como medio base

Medio de incubación	AMP <sub>c</sub> ** (picomolas/10 <sup>7</sup> espermatozoides)	R.A.*** (%)
Tyrode	9.47 ± 3.44 (7)	15.8 ± 4.3 (6)
Tyrode-glucosa	10.28 ± 5.46 (7)	16.3 ± 5.9 (7)
Tyrode-papaverina	58.54 (2)	8.1 (2)
Tyrode-glucosa-papaverina	144.09 (2)	19.9 (2)

\*Los espermatozoides se incubaron a 37°C en los medios señalados, a una concentración de 35 x 10<sup>6</sup> células/ml. La concentración final de la glucosa fue de 5.56 mM, y la de la papaverina de 5 µM.

\*\*La valoración de AMP<sub>c</sub> se realizó a los 15 y 30 seg de iniciada la incubación. Los valores mostrados en la tabla indican la media aritmética de las dos determinaciones ± la desviación estándar, (número de experimentos).

\*\*\*A los 5 min de iniciada la incubación se tomaron muestras alícuotas de las diferentes suspensiones, y el paquete celular se resuspendió en MCM. donde se valoro a RA

Efecto de la carencia de  $Ca^{+2}$ , en el medio de incubación de los espermatozoides, sobre su nivel intracelular de AMPc y el número de gametos que se capacitan en 5 min de incubación, en ausencia de substratos exógenos y en presencia de glucosa y/o papaverina

Se ha descrito un papel positivo del  $Ca^{+2}$  en la producción intracelular de AMPc en los espermatozoides de cuyo, mantenidos en condiciones capacitantes; así mismo, se ha señalado un papel positivo del nucleótido en la capacitación espermática. Pero, por otra parte, se ha encontrado que no es esencial la presencia del catión divalente en el medio de incubación para que los espermatozoides se capaciten. Esta ambigüedad de resultados, nos condujo a probar el efecto de la carencia de  $Ca^{+2}$  en el medio de incubación, sobre la producción de AMPc intracelular, con el objeto de obtener más evidencias sobre el papel del nucleótido en el proceso de la capacitación espermática.

- a) Contenido de AMPc al inicio de la incubación de los espermatozoides en NaCl- $NaHCO_3$  y en NaCl- $NaHCO_3$ -glucosa.

La incubación (37°C) de los espermatozoides de cuyo (como se indica en Métodos), en una solución de NaCl- $NaHCO_3$  indujo un incremento significativo en su contenido interno de AMPc, tanto en ausencia ( $p < 0.001$ ) como en presencia de glucosa ( $p < 0.001$ ) con respecto al basal, dentro de los primeros 30 seg de iniciada la incubación (Tablas 2 y 5). Los niveles intracelulares de AMPc de los gametos incubados

en el medio NaCl-NaHCO<sub>3</sub>, no fueron significativamente diferentes de los encontrados en los espermatozoides incubados en NaCl-NaHCO<sub>3</sub> adicionado de glucosa, en períodos cortos de incubación (15 y 30 seg) (Tabla 5).

Por otra parte, la carencia de Ca<sup>+2</sup> en el medio de incubación no parece afectar la producción de AMPc en los gametos, ya que el contenido intracelular del nucleótido fue muy similar en los espermatozoides incubados, en un medio con Ca<sup>+2</sup> o sin él (compárese el nivel intracelular de AMPc de los espermatozoides incubados en los medios: MCM, Tyrode y NaCl-NaHCO<sub>3</sub>; Tablas 3, 4 y 5).

- b) Efecto de la incubación durante 5 min en el medio NaCl-NaHCO<sub>3</sub> y en NaCl-NaHCO<sub>3</sub>-glucosa sobre la capacitación espermática.

La incubación de los espermatozoides, durante 5 min, en el medio NaCl-NaHCO<sub>3</sub> solo o con glucosa, indujo la capacitación de una pequeña proporción de la población espermática (Tabla 5). La presencia de glucosa en el medio no indujo una diferencia significativa, en el número de gametos capacitados en relación a su control.

Por otra parte, la población espermática capacitada por incubación corta en los medios carentes de Ca<sup>+2</sup>, no fue significativamente diferente de la población celular capacitada en los medios suplementados con el catión

divalente (Tabla 5 vs 3 y 4).

- c) Efecto de la incubación en NaCl-NaHCO<sub>3</sub> y en NaCl-NaHCO<sub>3</sub>-glucosa sobre la movilidad espermática.

Los espermatozoides incubados en NaCl-NaHCO<sub>3</sub> se inmovilizaron gradualmente, llegando a la inmovilidad total (de la población completa) en un período de 10-15 min de incubación. Las agrupaciones iniciales, empalizadas de 3 o más células, formaron rosetas pequeñas, que no se disgregaron en el transcurso de la incubación y no se observó R.A.

fisiológica dentro de una hora de incubación (control). La presencia de la glucosa alteró el patrón de movilidad y de asociación de los gametos, en forma similar a la descrita en MCMG y en Tyrode-glucosa; así mismo, la hexosa mantuvo inhibida la R.A. en las muestras control (seguidas hasta por una hora).

- d) Efecto de la papaverina sobre la elevación de AMPc y sobre el comportamiento de los gametos incubados en NaCl-NaHCO<sub>3</sub> y en NaCl-NaHCO<sub>3</sub>-glucosa. Como puede verse en la tabla 5, en la incubación de los espermatozoides en los medios carentes de Ca<sup>+2</sup>, la adición de papaverina no les indujo un mayor aumento en el nivel intracelular de AMPc, comparado con los niveles determinados en los gametos incubados, en uno u otro medio sin la papaverina.

El porcentaje de la población espermática que se capacitó en 5 min de incubación, en el medio NaCl-NaHCO<sub>3</sub>-glucosa-

papaverina fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ), que el determinado en los medios NaCl-NaHCO<sub>3</sub>, con glucosa o con papaverina, sin que el contenido de AMPc intraespermático fuese diferente entre ellos.

Por otra parte, la papaverina estimuló la inmovilización de los espermatozoides incubados en NaCl-NaHCO<sub>3</sub> y disminuyó la movilidad de los gametos mantenidos en NaCl-NaHCO<sub>3</sub>-glucosa; pero no alteró el efecto del carbohidrato sobre la expresión de la R.A. durante la incubación prolongada.

*Efecto de adición de un quelante de Ca<sup>+2</sup> al medio de incubación de los espermatozoides, sobre su nivel inicial de AMPc interno y sobre el número de gametos que se capacitan en 5 min de incubación, en ausencia de substratos exógenos y en presencia de glucosa y/o papaverina*

Los reactivos analíticos utilizados para preparar los medios de incubación contenían calcio como contaminante, a una concentración final calculada de 2.45  $\mu\text{M}$ , cantidad que podría estar ejerciendo algún efecto sobre la producción de AMPc intraespermático. Por ello, se decidió utilizar a un agente quelante, que eliminara este Ca<sup>+2</sup> contaminante; utilizamos a la sal disódica del ácido etilendiaminotetracético (EDTA), a una concentración de 12.25  $\mu\text{M}$  (5-veces la concentración de Ca<sup>+2</sup> contaminante); para poder observar el efecto de la carencia de catión divalente, en el medio de incubación, sobre la producción de AMPc intraespermático y sobre la capacitación de los gametos de cuyo.

TABLA 5

Efecto de la carencia de calcio sobre el contenido inicial de AMPc intraespermático y el número de espermatozoides que se capacitan en 5 min de incubación

Medio de* incubación	AMPc** (picomolas/10 <sup>7</sup> espermatozoides)	R.A.*** (%)
NaCl-NaHCO <sub>3</sub>	10.39 ± 3.23 (7)	12.2 ± 3.6 (7)
NaCl-NaHCO <sub>3</sub> -glucosa	10.89 ± 5.06 (6)	10.0 ± 3.4 (6)
NaCl-NaHCO <sub>3</sub> -papaverina	9.90 ± 5.90 (3)	13.3 ± 2.1 (3)
NaCl-NaHCO <sub>3</sub> -glucosa-papaverina	11.81 ± 8.76 (3)	19.2 ± 2.9 (3)

\*Los espermatozoides se incubaron bajo las condiciones descritas en Métodos. La concentración final de la glucosa fue de 5.56 mM y la de la papaverina de 5 µM.

\*\*La valoración del AMPc se realizó a los 15 y 30 seg de iniciada la incubación. Los valores mostrados representan la media aritmética de las dos determinaciones ± la desviación estándar (número de experimentos).

\*\*\*A los 5 min de incubación, se tomaron muestras alícuotas de cada incubación y se realizó la valoración de la R.A., como se describió en Métodos.

- a) Contenido inicial de AMPc de los espermatozoides incubados en NaCl-NaHCO<sub>3</sub>-EDTA y en NaCl-NaHCO<sub>3</sub>-EDTA-glucosa. Los espermatozoides de cuyo, al ser incubados a 37°C en el medio NaCl-NaHCO<sub>3</sub>-EDTA (como se indica en Métodos), incrementaron significativamente su contenido interno de AMPc, tanto en ausencia ( $p < 0.001$ ) como en presencia ( $p < 0.001$ ) de glucosa, con respecto al basal (Tablas 2 y 6), en periodos cortos de incubación (15 y 30 seg).
- La presencia de glucosa en el medio de incubación de los gametos, NaCl-NaHCO<sub>3</sub>-EDTA, no incrementó significativamente el nivel de AMPc intraespermático inducido por el medio (Tabla 6). No obstante, existió una tendencia a ser mayor el contenido del nucleótido, cuando las células se incubaron en el medio con el carbohidrato.
- La carencia absoluta de Ca<sup>+2</sup> externo no pareció alterar significativamente la producción intraespermática de AMPc, ya que el contenido del nucleótido fue muy similar entre los espermatozoides incubados en los medios que contenían Ca<sup>2+</sup>: 1.81 mM (Tyrode y Tyrode-glucosa), 1.17 mM (MCM y MCMG) y 2.45  $\mu$ M (NaCl-NaHCO<sub>3</sub> y NaCl-NaHCO<sub>3</sub>-glucosa) y en los incubados en ausencia total de Ca<sup>+2</sup> externo (NaCl-NaHCO<sub>3</sub>-EDTA y NaCl-NaHCO<sub>3</sub>EDTA-glucosa)
- b) Efecto de la incubación durante 5 min en el medio NaCl-NaHCO<sub>3</sub>-EDTA y NaCl-NaHCO<sub>3</sub>-EDTA-glucosa sobre la capacita-

ción espermática.

Una pequeña proporción de la población espermática se capacitó en 5 min de incubación en el medio totalmente carente de  $\text{Ca}^{+2}$  externo, tanto en ausencia de substratos exógenos, como en presencia de glucosa (Tabla 6). El número de gametos capacitados en el medio  $\text{NaCl-NaHCO}_3\text{-EDTA}$ , no fue significativamente diferente del obtenido al incubar a los gametos en el medio con glucosa, aunque los espermatozoides incubados en este último medio tendieron a incrementar más su contenido de AMPc.

Así mismo, la falta total de  $\text{Ca}^{+2}$  externo, en el medio de incubación, no alteró significativamente el porcentaje de espermatozoides capacitados en 5 min (Tabla 6 vs. 3, 4 y 5).

c) Efecto de la incubación en  $\text{NaCl-NaHCO}_3\text{-EDTA}$  y  $\text{NaCl-NaHCO}_3\text{-EDTA-glucosa}$  sobre la movilidad espermática.

Los espermatozoides incubados en  $\text{NaCl-NaHCO}_3\text{-EDTA}$  se inmovilizaron gradualmente, dentro de los primeros 10-15 min de incubación. Se conservó el patrón de asociación descrito en la solución de  $\text{NaCl}$  (empalizadas de 3 o más espermatozoides y rosetas pequeñas); y no se observó R.A. fisiológica en una hora de incubación (muestras control). Los gametos incubados en el medio adicionado de glucosa, mantuvieron buena movilidad, de tipo vibracional, durante todo el período de incubación y aun al ser transferidos a MCM (para valorar la presentación de la R.A.); las empali-

zadas iniciales se asociaron formando rosetas y grumos de diversos tamaños. La hexosa conservó su efecto inhibitorio sobre la expresión de la R.A. en las muestras control, seguidas hasta por una hora.

- d) Efecto de la papaverina sobre el contenido de AMPc y sobre el comportamiento de los espermatozoides incubados en NaCl-NaHCO<sub>3</sub>-EDTA y NaCl-NaHCO<sub>3</sub>-EDTA-glucosa.

La adición de papaverina al medio de incubación totalmente carente de Ca<sup>+2</sup>, con o sin glucosa no indujo un mayor incremento en el contenido de AMPc intracelular, dentro de los primeros 30 seg de incubación de los espermatozoides (Tabla 6), comparado con los inducidos en los gametos incubados en ambos medios sin el inhibidor. Aunque, parece existir una tendencia a ser mayor el contenido de AMPc, en los espermatozoides incubados en los medios con la papaverina.

La proporción de la población espermática capacitada en 5 min de incubación, en los medios sin Ca<sup>+2</sup> externo adicionados de papaverina, tendió a ser mayor en ambos, al igual que el contenido de AMPc, pero solo fue significativamente mayor en el medio carente de substratos ( $p < 0.05$ ).

Por otra parte, la papaverina indujo un patrón de movilidad y de asociación, en los gametos incubados en ambos medios, muy similar al descrito en los incubados en los medios con Ca<sup>+2</sup> contaminante. No se observó R.A. en las muestras

TABLA 6

Efecto de la adición de un quelante de calcio al medio de incubación, sobre el contenido inicial de AMPc intraespermático y el número de espermatozoides que se capacitan en 5 min de incubación

Medio de incubación*	AMPc** (picomolas/10 <sup>7</sup> espermatozoides)	R.A.*** (%)
NaCl-NaHCO <sub>3</sub> -EDTA	8.77 ± 2.91 (7)	11.3 ± 3.9 (7)
NaCl-NaHCO <sub>3</sub> -EDTA-glucosa	12.58 ± 4.18 (7)	9.7 ± 4.2 (7)
NaCl-NaHCO <sub>3</sub> -EDTA-papaverina	15.17 (2)	18.2 (2)
NaCl-NaHCO <sub>3</sub> -EDTA-glucosa-papaverina	19.28 (2)	17.8 (2)

\*Los espermatozoides se incubaron bajo las condiciones descritas en Métodos. La concentración final del EDTA, la glucosa y la papaverina fue de 12.25 µM, 5.56 mM y 5 µM, respectivamente.

\*\*El contenido de AMPc intraespermático se valoró a los 15 y 30 seg de iniciada la incubación. Los valores mostrados indican la media aritmética de las dos determinaciones ± la desviación estándar (número de experimentos).

\*\*\*A los 5 min de incubación se tomaron muestras alícuotas de cada incubación y se realizó la valoración de la R.A.

espermáticas incubadas hasta por una hora, en ambos medios.

*Contenido inicial de AMPc intraespermático y posible relación con el número de gametos que se capacitan a diferentes tiempos de incubación en MCM y MCMG*

Como podría haber la posibilidad de que, el efecto del nucleótido cíclico en el proceso de capacitación no se hiciera aparente en la población espermática, que manifiesta tal estado fisiológico (expresión de la R.A.) en períodos cortos de incubación, se decidió prolongar el tiempo de la incubación, para tratar de identificar alguna relación entre el nivel de AMPc y la capacitación de los espermatozoides.

Como indican los resultados mostrados en la tabla 7, los espermatozoides de cuyo incubados en el medio MCM o MCMG (bajo las condiciones indicadas en Métodos), incrementaron significativamente su contenido de AMPc ( $p < 0.001$ , para ambos medios), con respecto al basal. Por otra parte, la proporción de la población espermática que se capacitó, tanto en ausencia como en presencia de glucosa, no fue significativamente diferente entre sí ni a 5, 15, 30 o 60 min de incubación, a pesar de que el nivel de AMPc fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) en los gametos incubados en MCM adicionado de glucosa.

Parece ser que, la elevación del nivel de AMPc en los espermatozoides al inicio de su incubación en un medio capacitante, no

TABLA 7

Relación entre el contenido inicial de AMP<sub>C</sub> intraespermático y el número de gametos que se capacita a diferentes tiempos de incubación en MCM y MCM-glucosa

Medio de incubación*	AMP <sub>C</sub> ** (picomolas/ 10 <sup>7</sup> espermatozoides)	R.A. (%)***			
		5'	15'	30'	60'
MCM	10.69 ± 3.60 (29)	14.1 ± 4.4 (25)	15.7 ± 8.4 (13)	13.9 ± 8.9 (18)	18.2 ± 8.9 (12)
MCM-glucosa	18.69 ± 9.87 ( 8)	16.9 ± 9.9 ( 8)	13.4 ± 3.8 ( 4)	12.1 ± 2.0 ( 5)	11.1 ( 2)

\*Los espermatozoides se incubaron a 37°C, en los medios señalados, a una concentración de 35 x 10<sup>6</sup> células/ml. La concentración final de la glucosa fue de 5.56 mM.

\*\*La valoración del AMP<sub>C</sub> se realizó a los 15 y 30 seg de iniciada la incubación. Los valores mostrados indican la media aritmética de las dos determinaciones ± la desviación estándar (número de experimentos).

\*\*\*A los tiempos señalados de iniciada la incubación, en los medios indicados, se tomaron muestras alícuotas, se centrifugaron y el paquete celular se resuspendió en MCM donde se valoró la expresión de la R.A.

influye en forma aparente, en el número de gametos que expresan el estado "capacitado", a diferentes períodos de incubación.

*Efecto de imidazol, el citrato de sodio, de la 2-desoxi-D-glucosa y de la carencia de NaCl, sobre el contenido inicial de AMPc intracelular y el número de espermatozoides que se capacitan en 5 min de incubación en MCM*

Dado que los espermatozoides de cuyo, al ser incubados en un medio capacitante, incrementan a diferente nivel su contenido de AMPc al inicio de la incubación, cabría pensar que se requiere cierto nivel umbral del nucleótido para que el espermatozoide active los mecanismos dependientes de AMPc, que participan en la capacitación. Por ello, para tratar de obtener algún dato que ayudara a dilucidar tal posibilidad, se decidió utilizar algunos reactivos descritos en la literatura como agentes depresores del contenido intracelular de AMPc.

Los reactivos utilizados para inducir niveles bajos de AMPc intraespermático fueron: imidazol 7 mM, (Rogers y García, 1979); citrato de sodio 10 mM (Haesungcharerm y Chulavatnatol, 1978); y 2-desoxi-D-glucosa 5.56 mM (Mújica, comunicación personal). También se eliminó al NaCl del medio MCM, con o sin glucosa, para inducir niveles bajos de AMPc en los gametos (Moreno, 1985). El NaCl fue substituido por una cantidad equivalente de sacarosa, para mantener la osmolaridad de los medios de incubación.

### *Efecto de imidazol*

Los espermatozoides de cuyo al ser incubados en el medio MCM adicionado de imidazol, incrementaron significativamente ( $p < 0.001$ ) sus niveles de AMPc, dentro de los primeros 30 seg de incubación, con respecto al basal (Tabla 8). No obstante una preincubación de los gametos en NaCl-imidazol (147 mM y 7 mM, respectivamente) durante 1, 2 o 5 min antes de ser incubados en el medio MCM-imidazol, el contenido del nucleótido cíclico intraespermático valorado a los 15 y 30 seg no disminuyó significativamente, comparado con el de los gametos preincubados en NaCl (154 mM) durante 1, 2 o 5 min incubados en MCM sin imidazol.

Aunque la presencia del imidazol, estimulante de la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos, no alteró significativamente el contenido de AMPc intraespermático, sí disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ ) el número de gametos capacitados en 5 min de incubación. Por otra parte, la presencia del imidazol no alteró los patrones de movilidad y agregación espermática, con respecto al control (MCM).

### *Efecto del citrato de sodio*

La incubación de los espermatozoides (como se indica en Métodos), en el medio MCM adicionado de citrato de sodio, indujo un incremento significativo ( $p < 0.001$ ) del contenido de AMPc intraespermático, dentro de los primeros 30 seg de iniciada la incubación; igual que en el MCM (control). Al parecer, sin afectar apreciablemente la actividad de la adenilato ciclasa, el citrato inhibió la capacita-

ción de los espermatozoides, tanto a 5 min (Tabla 8), como a 15 y 30 min de incubación (datos no mostrados).

La movilidad y el patrón de asociación de los gametos incubados en MCM-citrato fueron muy similares los descritos para los espermatozoides incubados en MCM.

#### *Efecto de la 2-desoxi-D-glucosa*

Los espermatozoides de cuyo, incubados en MCM-2-desoxi-D-glucosa (como se indica en Métodos), aunque incrementaron significativamente ( $p < 0.05$ ) su contenido de AMPc dentro de los primeros 30 seg de incubación, con respecto a su contenido basal, no lo hicieron tanto como los gametos incubados en MCM (control).

La presencia de la 2-desoxi-D-glucosa, en el medio de incubación de los gametos, parece alterar su capacitación, ya que, no se detectó R.A. fisiológica en espermatozoides transferidos a MCM, después de 5 min (Tabla 8) o 15 min (datos no mostrados) de incubación en MCM-2-desoxi-D-glucosa.

El análogo no metabolizable de la glucosa, disminuyó la movilidad de los gametos así como su patrón de agrupación, el cual fue predominantemente de rosetas y grumos pequeños.

#### *Efecto de la carencia de NaCl*

Los espermatozoides de cuyo, extraídos de los conductos deferentes con solución de NaCl (154 mM) y lavados (2X) con

solución de sacarosa (308 mM), al ser incubados en el medio MCM sin NaCl no sintetizaron AMPc, a un nivel detectable bajo las condiciones de ensayo utilizadas, ni aun con la adición de glucosa al medio de incubación (Tabla 8).

Así mismo, la ausencia de NaCl en el medio de incubación de los espermatozoides, indujo no sólo la inhibición de la capacitación, sino que también indujo la inmovilización temprana de los gametos incubados en el medio MCM solo o adicionado de glucosa (dentro de los primeros 5 min de incubación). Por otra parte, el patrón de asociación espermática fue muy similar al descrito para los gametos incubados en NaCl, bajo las mismas condiciones de incubación.

TABLA 8

Efecto del imidazol, del citrato de sodio, de la 2-desoxi-D-glucosa y de la carencia de NaCl, sobre el contenido inicial de AMPc intracelular y el número de espermatozoides que se capacitan en 5 min de incubación en MCM

Medio de incubación**	AMPc*** (picomolas/10 <sup>7</sup> espermatozoides)	R.A.**** (%)
NaCl	2.72 ± 1.23 (7) (basal)	0.0*
MCM	10.69 ± 3.60 (29)	13.6 ± 4.5 (28)
MCM-imidazol	9.01 ± 5.46 (6)	8.4 ± 7.5 (6)
MCM-citrato	9.83 (1)	0.0* (1)
MCM-2-desoxi-D-glucosa	4.65 ± 1.30 (4)	7.9* ± 2.3 (4)
MCM-sacarosa (sin NaCl)	0.00 (2)	2.7* (2)
MCM-sacarosa-glucosa (sin NaCl)	0.00 (2)	2.0* (2)

\*Muestras espermáticas que no presentaron R.A. cualitativamente dentro de los primeros 15 min de su transferencia a MCM

\*\*Los espermatozoides se incubaron bajo las condiciones descritas en Métodos. La concentración final de los reactivos utilizados fue la siguiente: imidazol 7 mM, citrato de sodio 10 mM, 2-desoxi-D-glucosa 5.56 mM; la concentración de la sacarosa fue equivalente a la del NaCl substituido.

\*\*\*La valoración de AMPc se realizó a los 15 y 30 seg de iniciada la incubación. Los valores mostrados representan la media aritmética de las dos determinaciones ± la desviación estándar (número de experimentos)

\*\*\*\*A los 5 min de incubación se tomaron muestras alícuotas de cada incubación y se realizó la valoración de la R.A.

## DISCUSION

Este estudio provee un análisis cuantitativo del contenido de AMPc intracelular, encontrado al inicio de la incubación de los espermatozoides de cuyo en diferentes medios capacitantes, *in vitro*, y la relación con el tiempo de su capacitación.

*Contenido basal de AMPc*

El contenido basal de AMPc de los espermatozoides de cuyo incubados en NaCl durante 15 y 30 seg determinado en este estudio, fue de 2.72 pmolas por  $10^7$  células valor muy similar al comunicado por Hyne y Garbers (1979), así como al encontrado en los gametos de otras especies de mamíferos (Stein y Fraser, 1984). La variabilidad observada entre el contenido basal de AMPc de un grupo de cuyos y otro, que va desde una concentración no detectable por el sistema de ensayo utilizado hasta 5.78 picomolas/ $10^7$  células, también ha sido encontrada en varias cepas de ratón y aun entre individuos de una misma cepa, mantenidos bajo condiciones ambientales idénticas (Erickson y col., 1979; Nadijcka y Hillman, 1980).

Por la incubación de los espermatozoides en NaCl hasta por 5 min, se observó una tendencia a disminuir el contenido de AMPc (Tabla 2). Dado que esta solución salina carece de substratos, no tiene capacidad amortiguadora, y no es medio de incubación capacitante (Valdés, 1981), es posible pensar que el espermatozoide se mantenga en un estado de reposo y por ello no active vías metabólicas específicas.

*Contenido de AMPc de los espermatozoides incubados en un medio capacitante, con y sin glucosa*

Los espermatozoides de cuyo incrementan abruptamente su contenido de AMPc dentro de los primeros 30 seg de iniciada la incubación en un medio capacitante, Esta elevación de la concentración del nucleótido ha sido descrita para los gametos de hámster (Morton y col., 1974), de toro (Cascieri y col., 1976) y de ratón (Stein y Fraser, 1984); aunque la concentración máxima encontrada en los gametos de las diferentes especies (Garbers y Kopf, 1980) y aun de la misma especie (Hyne y Garbers, 1979; Garbers y col., 1982) es variable.

No obstante que el incremento a 30 seg de incubación del contenido de AMPc intraespermático parece ser independiente del medio utilizado un efecto potenciador de la glucosa fue observado, sobre todo en los gametos incubados en MCM. Es decir, la glucosa les induce un incremento adicional en sus niveles del nucleótido cíclico al tiempo señalado.

El incremento adicional del contenido de AMPc, inducido por la hexosa, parece ser influenciado por la composición del medio de incubación. Como puede verse en los resultados (Tabla 4). En el medio de Tyrode la glucosa no parece inducir un incremento significativo del contenido de AMPc, pero con la papaverina, su efecto sí se hace evidente. Esto podría indicar que el espermatozoide posee una mayor actividad de fosfodiesterasa de AMPc, cuando se incuba en el medio de Tyrode. O bien, que la menor concentración de bicarbonato en este medio (Tabla 1), influya en la producción de AMPc en ausencia de papaverina, ya que, Garbers y col., (1982),

comunicaron la dependencia del sistema de la adenilato ciclasa del ion bicarbonato para su actividad. Consideramos que este punto, para aclararse, requiere de mayores estudios.

*Efecto del calcio sobre la elevación inicial de AMPc intraespermático*

A diferencia de Hyne y Garbers (1979a), en el presente trabajo no se encontró que la elevación inicial del contenido de AMPc intraespermático sea dependiente del  $\text{Ca}^{+2}$  extracelular (Tablas 5 y 6). Dado que en el medio deficiente del catión divalente ( $\text{NaCl-NaHCO}_3$ , solo y adicionado de EDTA), los espermatozoides incrementaron su nivel de AMPc dentro de los primeros 30 seg de incubación, tanto como en los medios suplementados con  $\text{Ca}^{+2}$  (Tablas 3 y 4). Los resultados obtenidos podrían deberse a que la concentración contaminante del catión divalente ( $2.45 \mu\text{M}$ , calculada) en el medio  $\text{NaCl-NaHCO}_3$  fuera suficiente, para permitir la elevación del AMPc; Hyne y Garbers (1979a) indican que el  $\text{Ca}^{+2}$  a concentraciones micromolares es capaz de estimular a la adenilato ciclasa de espermatozoides de cuyo. Por otra parte, el efecto que tiene el EDTA de promover la salida de  $\text{Ca}^{+2}$  de los almacenes intracelulares (Trosper y Phillipson, 1984) podría estar incrementado la concentración del catión y éste, a su vez, podría estimular la síntesis de AMPc.

Un aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  en microambientes intracelulares podría ser potenciado por el mismo AMPc sintetizado, como se describió en los islotes pancreáticos. En éstos, la liberación de insulina inducida por glucosa involucra una

movilización mediada por AMPc del calcio de los almacenes intracelulares (Charles y col., 1975; Malaisse y Malaisse-Lagae, 1984). Sin embargo, dado que en un medio suplementado con  $\text{Ca}^{+2}$ , donde el efecto del AMPc sobre la liberación del catión de los almacenes intraespermáticos podría estar ocurriendo más activamente, no se encontró una mayor concentración de AMPc; por ello, se puede considerar que es poco probable la relación entre la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por AMPc y mayor síntesis de este último inducida por el catión.

*Efecto del calcio sobre la elevación del AMPc inducida por glucosa*

Los resultados sugieren que el incremento adicional del nivel de AMPc intraespermático, mediado por glucosa, sí es dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$  extracelular; como en el caso de la elevación del nucleótido inducida por el mismo carbohidrato, en islotes pancreáticos (Charles y col., 1975).

Moreno (1985) propuso al calcio como un posible inductor del estímulo de la síntesis del nucleótido inducido por glucosa. Malaisse (1984), comunicó que la síntesis de AMPc, mediada por glucosa, en los islotes pancreáticos se debe al estímulo del complejo Ca-Calmodulina sobre la adenilato ciclasa; y, en los espermatozoides de cuyo, se han identificado grandes cantidades de calmodulina (Jones y col., 1980). Por ello, la participación de un sistema semejante al descrito en las células pancreáticas, para la acción de la glucosa sobre la síntesis de AMPc en el espermatozoide de mamíferos, debería ser considerada.

*Efecto del ión sodio sobre la síntesis de AMPc en los espermatozoides de cuyo*

La síntesis de AMPc en los espermatozoides de cuyo parece ser dependiente de la presencia de una concentración de  $\text{Na}^+$  extracelular mayor de 30 mM, ya que en el medio de incubación con no más de 30 mM de sodio no se detectó la síntesis del nucleótido, tanto en ausencia como en presencia de glucosa (Tabla 8). Jakobs y col., (1984), encontraron que el  $\text{Na}^+$  es indispensable para la actividad de la adenilato ciclasa regulada por hormonas, tanto en plaquetas de humano como en células de linfoma murino S49, donde se propone que el sodio facilita la interacción entre las subunidades que integran al sistema de la adenilato ciclasa para que se active.

*AMPc y capacitación espermática*

Bajo nuestras condiciones experimentales, la magnitud del incremento inicial del contenido de AMPc no parece tener una relación directa con el tiempo de capacitación de los espermatozoides de cuyo. Ya que, a pesar de que el nivel de AMPc es mayor en los gametos incubados en un medio suplementado con glucosa, papaverina o ambas, la proporción de la población espermática que se capacitó en 5, 15, 30 o 60 min de incubación no fue significativamente diferente entre ellos ni con sus controles. Estos resultados, obtenidos bajo condiciones que se pueden considerar más indicativas de verdadera capacitación (véase antecedentes), concuerdan con los hallazgos de Hyne y Garbers (1979), en espermatozoides de cuyo; e

igualmente con los resultados de Stein y Fraser (1984), quienes encontraron que el incremento del nivel del nucleótido, al inicio de la incubación de los espermatozoides de ratón, en un medio capacitante, no mostraba una relación directa con el tiempo de capacitación.

#### *Capacitación espermática en MCM*

Los experimentos preliminares donde se observó que los espermatozoides incubados durante 5 min en el medio MCM no se capacitaban, fueron realizados con una variación en el manejo de las células; los gametos fueron lavados (2X) con 0.5 ml de NaCl 154 mM por espermatozoides provenientes de un conducto deferente, y en los experimentos subsecuentes los dos lavados se realizaron utilizando 1 ml de NaCl 154 mM cada vez por espermatozoides provenientes de un conducto deferente.

La variación en el lavado de los gametos no induce ningún cambio aparente sobre el incremento inicial de AMPc intraespermático (datos no mostrados); pero, sí tiene efecto sobre la velocidad de capacitación espermática. Un lavado en menor volumen de solución de los espermatozoides retarda su tiempo de capacitación (Rogers, 1978), dado que pueden retener fluido epididimal a un nivel capaz de inhibir este fenómeno. Además, la remoción de un factor(es) unido a la membrana plasmática que impide la capacitación (factor descapacitante o factor estabilizante de la membrana) (Williams y col., 1976; Oliphant, 1976), cuyo origen es el líquido del epidídimo y/o el plasma seminal (Chang, 1957; Weinman y Williams, 1964); así como la pérdida de componentes específicos de la membrana plasmática (Brackett y Oliphant, 1975; Oliphant, 1976); han sido descritos como

esenciales para que el gameto masculino se capacite, y estos procesos los facilita el lavado de las células con volúmenes mayores de solución.

#### *Efecto de la papaverina sobre la relación AMPc-capacitación*

Debido a que con todos los medios capacitantes ensayados no se observó una relación directa entre la elevación inicial de AMPc y el tiempo de capacitación, se decidió utilizar a la papaverina para tratar de amplificar el posible efecto del AMPc intracelular sobre dicho proceso.

No obstante la gran elevación en el nivel inicial de AMPc intraespermático inducida por la papaverina, la proporción de la población espermática que se capacitó en 5 min de incubación, en cualquiera de los medios suplementados con  $\text{Ca}^{+2}$ , no fue significativamente diferente de la proporción de espermatozoides capacitados en ausencia del inhibidor. Lo que apoya adicionalmente la no existencia de una relación directa entre el nivel inicial de AMPc y la capacitación espermática.

El que la papaverina no amplifique en gran medida la elevación de AMPc en el medio carente de  $\text{Ca}^{+2}$  (Tablas 5 y 6), podría deberse a que: 1) tanto la actividad de la adenilato ciclasa como la de la fosfodiesterasa de AMPc se encuentren disminuidas y por coincidencia o no, dentro de los primeros 30 seg de incubación se presente un nivel de AMPc semejante al encontrado en presencia de calcio; 2) la actividad de la adenilato ciclasa se deprima por una caída de la

concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  a un nivel similar al que tiene la célula en reposo, después de utilizar el  $\text{Ca}^{+2}$  que se encuentre en su microambiente, por lo cual sólo se observaría el incremento momentáneo del contenido de AMPc y no la amplificación por la presencia de la papaverina; y, 3) que la papaverina requiera de  $\text{Ca}^{+2}$  exógeno para ejercer su efecto inhibitorio sobre la actividad de la fosfodiesterasa de AMPc y, además, que esta necesidad del catión divalente involucre el requerimiento de concentraciones mayores de  $\text{Ca}^{+2}$  que las que contienen los medios deficientes en el catión. Esta última posibilidad es poco probable, dado que la acción principal de la papaverina es una inhibición competitiva de la fosfodiesterasa de AMPc, y aunque uno de sus efectos secundarios es la inhibición de los mecanismos de influjo y eflujo del  $\text{Ca}^{+2}$  (Huddart y col., 1984), esta propiedad solo ha sido observada a concentraciones 20 o 25 veces superiores a las utilizadas en este trabajo.

*Efecto de la disminución de los niveles intraespermáticos del AMPc sobre la capacitación de los espermatozoides*

Como puede verse en la figura 6, la magnitud del incremento del nivel de AMPc intraespermático varía de una población celular a otra, sin depender en gran medida de la composición del medio de incubación y, aunque la elevación del nucleótido no parece tener influencia directa sobre el tiempo de capacitación de los espermatozoides de cuyo, se puede notar que, bajo condiciones capacitantes el incremento del contenido de AMPc al inicio de la incubación siempre se presenta.

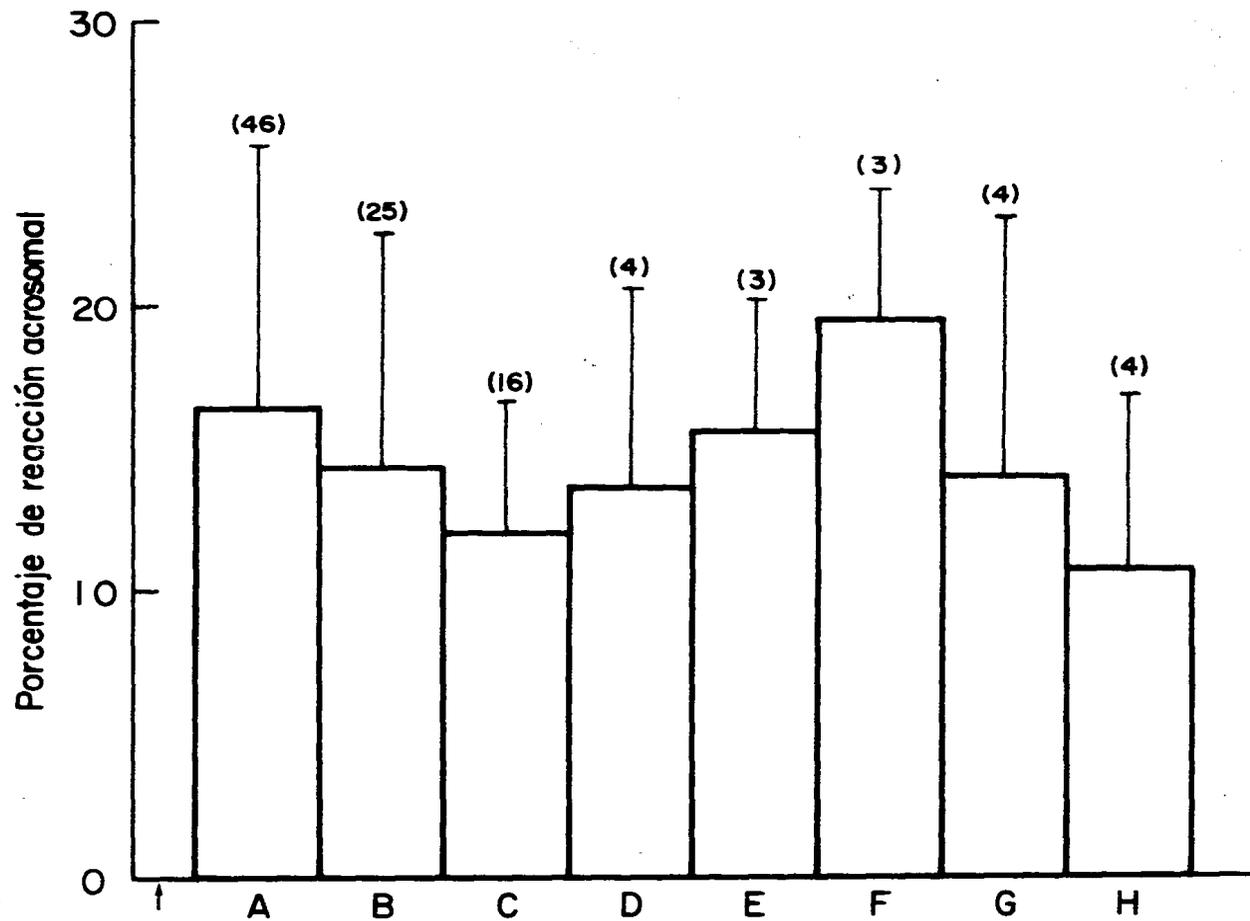


Fig. 6. Relación entre el contenido inicial de AMPc intraespermático y el número de gametos que se capacitan en 5 min de incubación en un medio capacitante. En la figura se muestra el arreglo de las muestras experimentales en base a su contenido de AMPc inicial, independientemente del medio de incubación empleado. Los rectángulos muestran el porcentaje de RA  $\pm$  la desviación estándar (número de experimentos). Las bases de los rectángulos muestran los rangos de concentración de AMPc (determinado como se indica en métodos): A (5.0 - 10.0), B (10.1 - 15.0), C (15.1 - 20.0), D (20.1 - 30.0), E (30.1 - 40.0), F (40.1 - 50.0), G (50.1 - 75.0), y H (75.1 - en adelante); la flecha indica el contenido basal de AMPc intraespermático (picomolas/ $10^7$  espermatozoides)

Litvin y col., (1984) indican que las dos isoenzimas (Tipo I y II) que fosforilan protefmas al ser activadas por el AMPc, requieren de una concentración umbral de AMPc para activarse selectivamente. El hecho de que siempre se presente un incremento del contenido de AMPc al inicio de la incubación podría sugerir que, el espermatozoide de cuyo requiere de un incremento en su contenido de AMPc durante el inicio de su capacitación, que se podría denominar "umbral de activación" de los mecanismos que dependen del nucleótido cíclico y que participan en la capacitación.

Para tratar de esclarecer la posibilidad de que el espermatozoide necesite de una concentración umbral de AMPc para iniciar su capacitación, se utilizaron algunos sistemas, descritos por diferentes autores, que actúan negativamente sobre la acumulación de AMPc intracelular. Sin embargo, dado que ninguno de los sistemas utilizados permitió variar a voluntad el nivel intraespermático del nucleótido cíclico, no es posible sacar conclusiones concretas.

Solo con la inclusión de la 2-deoxi-D-glucosa o la eliminación del NaCl del medio de incubación se logró disminuir la elevación inicial del AMPc intraespermático (Tabla 8). Con el análogo de la glucosa el nivel de AMPc llegó a ser similar al basal y, en el caso de la deficiencia del NaCl del medio de incubación no se detectó AMPc intraespermático y, en ambos casos, no ocurrió la capacitación espermática. Lo anterior podría indicar que no se logró alcanzar el umbral de AMPc que permite que la capacitación

se lleve a cabo. Por ello, se sugiere que se requiere estudiar más a fondo la posibilidad de que exista un requerimiento crítico de AMPc, para que el espermatozoide de los mamíferos inicie su capacitación.

Por otra parte el que el imidazol, activador de la PD, no indujera un menor nivel de AMPc podría deberse al corto tiempo de exposición de los gametos a tal reactivo (5 min en NaCl y 30 seg en el medio de incubación), ya que Garbers y col., (1971) encontraron que el imidazol disminuía el contenido de AMPc de los espermatozoides de toro bajo período de incubación de 2 a 6 horas.

En cuanto al citrato, Haesungcharern y Chulavatnatol (1978) encontraron que inhibía la actividad de la adenilato ciclasa en fracciones particuladas de espermatozoides de humano, mientras que en los espermatozoides intactos de cuyo no se observó este efecto (Tabla 8). Sin embargo, sin alterar los niveles de AMPc, el citrato aparentemente inhibió la capacitación de los espermatozoides. Esta inhibición podría deberse a una disminución del metabolismo espermático. Hoskins y col. (1970) encontraron que el citrato inhibe la actividad de la fosfofructocinasa de espermatozoides de primate. Además, la necesidad de un aumento en el metabolismo glucolítico y en la velocidad respiratoria son señalados como requisitos para que el espermatozoide se capacite (Hamner y Williams, 1963). La acción del citrato también podría explicarse en base a su propiedad de quelar al  $Ca^{+2}$ , un exceso de citrato en el espermatozoide podría inhibir la presentación de la RA, ya que

este fenómeno es dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ .

El que algunos investigadores hayan señalado efectos positivos del AMPc sobre la capacitación podría deberse a varios factores que no fueron contemplados en este trabajo. Por ejemplo: 1) cuando utilizan algún inhibidor de la PD, éste permanece en contacto con el espermatozoide durante todo el periodo de incubación hasta que es valorado algún parámetro indicativo de la capacitación (presentación de RA; fertilización de óvulos, homólogos o heterólogos). La presencia del inhibidor hace que el gameto mantenga elevado su contenido de AMPc por más tiempo, con respecto a su nivel basal (Hyne y Garbers, 1979; Fraser, 1981; Perreault y Rogers, 1982; Stein y Fraser, 1984), que es lo que podría inducir la estimulación de la capacitación y no la elevación inicial sola. Por otra parte, en presencia del inhibidor de la PD se observó que la viabilidad de la población celular disminuye considerablemente, y se sabe que los espermatozoides muertos contribuyen a que, en el microambiente de los gametos vivos, exista más AMPc y mayor actividad de cinasa de proteínas dependiente del mismo nucleótido (Fabre y col., 1982; Horowitz y col., 1984), que podrían estar ejerciendo algún efecto positivo sobre el proceso de la capacitación. 2) al utilizar algún análogo del AMPc, éste podría estar actuando tanto en el interior del espermatozoide como en su membrana plasmática para producir la estimulación de la capacitación. A pesar de que esto último no ha sido investigado, sí se han identificado las dos cinasas (Tipo I y II) que fosforilan

proteínas específicas al ser activadas por el AMPc (Majumder, 1981; Wilson y col., 1982, 1983; Fabro y col., 1982; Schoff y col., 1982; Horowitz y col., 1984; Atherton y col., 1985; Freedman y Koff, 1985); así como algunos substratos de éstas (Huacuja y col., 1977; Brandt y Hoskins, 1980; Noland y col., 1984; Tash y col., 1984), que se localizan en la superficie externa de la membrana plasmática del espermatozoide de diversas especies de mamífero. Estas fosfoproteínas membranales podrían promover la capacitación espermática por alterar mecanismos bioquímicos, tales como la captación de iones, estabilidad de la membrana, y otros.

Se ha postulado que la captación de  $\text{Ca}^{+2}$  (Raphaeli y Parsons, 1982) y la de  $\text{Na}^{+}$  (Costa y col., 1982) son procesos regulados a nivel de membrana plasmática y, aunque no se ha comprendido en detalle los mecanismos involucrados, se cree que la fosforilación de proteínas intramembranales está involucrada (Tash y Means, 1982, 1983; Atherton y col., 1985; Freedman y col., 1985).

La entrada de iones al espermatozoide, sobre todo del  $\text{Ca}^{+2}$ , podría promover diversos mecanismos que operen en la capacitación del gameto. En el espermatozoide el  $\text{Ca}^{+2}$  podría participar en la regulación de: 1) la activación y regulación de la movilidad, por regular la actividad de ATPasa de la dineína (Gordon y col., 1983); la polimerización, estabilización y despolimerización de microfilamentos y microtúbulos, así como en la alteración de las propiedades de la matriz celular (Dedman, 1984); 3) la estimulación de la actividad de la adenilato ciclasa (Hyne y Garbers, 1979a);

4) la secreción de macromoléculas y electrolitos (Stambaugh y col., 1978; Case, 1984); 5) la activación de la PD (Itoh e Hidaka, 1984; Wasco y Orr, 1984); 6) la activación de cinasas de proteínas, vía  $\text{Ca}^{+2}$ -fosfolípidos o bien  $\text{Ca}^{+2}$ -calmodulina (Klee y Newton, 1983; Kimura y col., 1984); 7) la activación de fosfoproteín fosfatasas (King y Huang, 1984; Soucek y Vary, 1984); 8) la alteración de los componentes lipídicos de las membranas (Papahadjopoulos, 1978); y de otras.

Se sabe que existen cantidades considerables de AMPc exógeno en los líquidos que bañan al espermatozoide durante su tránsito por el tracto reproductor femenino (en: Majumder, 1981), hasta que alcanza al óvulo y lo fertiliza. Se podría plantear que los mecanismos dependientes de AMPc, en el espermatozoide, se activan cuando el gameto se encuentra en el tracto reproductor de la hembra y no antes; ya que a pesar de que los fluidos del tracto reproductor del macho contienen cantidades considerables de AMPc (Mann y Lutwack-Mann, 1981), también contienen inhibidores potentes de la actividad de cinasa de proteínas, (Freedman y Kopf, 1985); inhibidores que no han sido identificados en los de la hembra.

El que en este trabajo no se haya encontrado relación entre el contenido inicial de AMPc y el tiempo de capacitación de los espermatozoides de cuyo, podría también deberse a que, bajo las condiciones de ensayo utilizadas, no son detectables alteraciones en el contenido del nucleótido cíclico en regiones intraespermáticas específicas. Dada la gran compartimentalización que existe en

esta célula (Fawcett, 1975; Roger y col., 1985), podría ser que el AMPc sea metabolizado en forma diferente en las diversas regiones del gameto; por lo que su distribución, disponibilidad, utilización y degradación sea diferente en un sitio específico del espermatozoide.

Además, hay que agregarle a esto, el que la población celular con la que se trabaja es muy heterogénea, en cuanto a su estado metabólico y maduracional (Bedford, 1983). Esto podría traducirse en una asincronía en la producción del incremento de AMPc intra-espermático, así como en la expresión de una relación entre este evento y la capacitación. Esto podría evitarse haciendo una selección de la población celular utilizada; lo que se puede asemejar a lo ocurrido naturalmente, ya que sólo los espermatozoides de mejores características son los que llegan al sitio de fertilización del óvulo (Crozet y Dumont, 1984; Hunter y Wilmut, 1984); como lo ha hecho Wall y col. (1984) quienes utilizando gradientes de albúmina serica bovina, han logrado separar, de una población heterogénea, una homogénea de gran movilidad. O bien, utilizar algún otro procedimiento o diseño experimental para valorar cambios en el metabolismo espermático de localización intracelular específica. De forma más directa, se puede proponer la utilización de inhibidores de cinasas de proteínas dependientes de AMPc; como las isoquinolinsulfonamidas, sintetizadas y descritas por Hidaka y col. (1984), las cuales inhiben específicamente a las cinasas de

proteínas dependientes de nucleótidos cíclicos; como herramientas útiles para clarificar las funciones de las mismas, y con ello las del AMPc, en los procesos que conducen a la capacitación espermática, tanto *in vivo* como *in vitro*.

#### *Movilidad y AMPc*

Al igual que el contenido de AMPc la movilidad de los espermatozoides de cuyo mantenidos en un medio no capacitante y carente de substratos (NaCl, 154 mM) tiende a disminuir conforme pasa el tiempo. Como el contenido basal de ATP parece no alterarse en los primeros seg de incubación (Mújica, comunicación personal), la movilidad parecería no ser causada por la carencia de substratos, sino por la inhabilidad que tiene el gameto para utilizar al ATP; aunque también podría existir alguna relación con la disminución del contenido de AMPc, aunque esta relación no ha sido estudiada hasta el momento.

Por otra parte, no debemos olvidar que el pH extracelular influye en el pH intraespermático (Christen y col., 1982) y la solución de NaCl, medio de incubación utilizado para valorar el nivel basal de AMPc intraespermático, tiene un pH de 6.03, el cual puede estar influyendo en la inhibición de la movilidad espermática. Esto es apoyado por los resultados de Murphy y Yanagimachi (1984), quienes encontraron que la movilidad de los espermatozoides de cuyo se reduce considerablemente a pH 6.1 y sugirieron, que la movilidad espermática está asociada con un eflujo de protones intra-

celulares, con el consiguiente aumento de pH intracelular. Esta sugerencia ha sido confirmada por Vijayaraghavan y col., (1985) quienes, estudiando espermatozoides de bovino, hallaron evidencias que indican que se requiere de la alcalinización del citosol flagelar para que se desarrolle la movilidad del gameto inducida por el AMPc. Christen y col. (1982) señalan que el pH básico inducido por la salida de protones, estimula la actividad de ATPasa de la dineina, lo cual sugiere que el espermatozoide mantenido en NaCl se inmoviliza por no poder utilizar el ATP requerido por el axonema para inducir la movilidad; aunque ésto no desecha la posibilidad de que el contenido de AMPc, presente en este estado, influya sobre la movilidad, ya que se sabe que el  $\text{Ca}^{+2}$  influye sobre la actividad de ATPasa de la dineina (Tash y Means, 1983) y, a su vez, el AMPc influye sobre la entrada y actividad del catión divalente.

La movilidad escasa o ausente de los espermatozoides mantenidos en NaCl 154 mM, se reactiva dentro de los primeros 60 a 150 seg, dependiendo del tiempo que pasen en contacto con la solución salina y de la composición del medio en el que se incuben. Aunque no ha sido descrito el tiempo exacto que transcurre entre la elevación del contenido de AMPc intracelular y la activación de la movilidad de los gametos completos y viables de cuyo, este puede ser muy similar al que se determinó, ya que Morton y col. (1974) y Cascieri y col. (1976), señalan que se requiere de 60 a 120 seg para que el incremento del nivel de AMPc induzca la movilidad

progresiva de los espermatozoides de hámster y de toro, respectivamente. En este tiempo podría ocurrir la fosforilación de proteínas específicas, realizada por las cinasas dependientes de AMPc, tanto de membrana plasmática como del citosol y del axonema (Tash y Means, 1982, 1983; Hoskins y col., 1983, 1984; Noland y col., 1984; Tash y col., 1984), que se postula participan en el mecanismo de activación de la movilidad inducida por el AMPc.

Se observó que la presencia de glucosa en el medio de incubación les induce a los espermatozoides un movimiento muy activo de vibración, que se conserva aun después de ser transferidos a MCM para la valoración de la RA. Este efecto de la glucosa sobre la movilidad espermática, ya ha sido descrito (Mújica y Valdés, 1983; Moreno, 1985). Podría ser que el mecanismo de acción de la hexosa para inducir el movimiento de vibración activado, en los espermatozoides de cuyo, podría involucrar la participación del AMPc o bien del ATP, ya que la glucosa induce un incremento adicional en el contenido de AMPc y el carbohidrato es el substrato exógeno preferentemente utilizado por los espermatozoides para obtener energía (Garbers y Kopf, 1980). Sin embargo, en el medio de Tyrode-glucosa y en el de NaCl-NaHCO<sub>3</sub>-glucosa (Tablas 4 y 5), el incremento adicional del nucleótido cíclico no se presentó, mientras que el movimiento activo de vibración sí fue observado. Esto podría indicar que el tipo de movimiento espermático inducido por la hexosa, no está relacionado al incremento adicional de AMPc, lo cual concuerda con los hallazgos de Moreno (1985).

Esto lo refuerzan los resultados obtenidos al incubar a los gametos en un medio adicionado de papaverina, donde el incremento adicional del nivel del nucleótido es exagerado y sin embargo, la movilidad de los espermatozoides no aumenta. Además, Tash y Means (1983) indican, que un incremento en nivel de AMPc en gametos masculinos móviles no tiene ningún efecto extra sobre la movilidad, sólo la reactiva en gametos con escasa movilidad o inmóviles.

En experimentos preliminares se ha encontrado que la glucosa induce un incremento del nivel de ATP espermático (datos no mostrados), dentro de los primeros 15 seg de iniciada la incubación; este incremento del contenido de ATP podría ser el responsable directo de la movilidad activada inducida por el carbohidrato. Esto es respaldado por los resultados encontrados al incubar a los espermatozoides en un medio carente de substratos exógenos (NaCl-NaHCO<sub>3</sub>, solo o adicionado de EDTA), donde las células pierden paulatinamente su movilidad a pesar de que su contenido inicial de AMPc es similar al de las células incubadas en un medio suplementado con substratos exógenos (piruvato y lactato).

Lo anterior sugiere que el incremento inicial del nivel de AMPc intraespermático participe en la activación de los mecanismos que permiten que el espermatozoide adquiera la movilidad activa, observada al incubarlo en un medio capacitante; lo cual concuerda con todos los trabajos descritos en la literatura sobre el efecto estimulador del AMPc sobre la movilidad espermática (Garbers y col., 1971; Garbers y Kopf, 1980; Tash y Means, 1982, 1983;

Bellvé y O'Brien, 1983; Hoskins y col., 1983, 1984; Tash y col., 1984). Esto no indica que el incremento inicial del nivel de AMPc no participa en otros procesos espermáticos, por lo que no se puede eliminar la posibilidad de que el espermatozoide requiera de una concentración interna específica ("umbral de activación") de AMPc, para que se inicien los procesos que lo conducen al estado capacitado.

Es obvia la necesidad de realizar más estudios para poder conocer la naturaleza del(os) inductor(es) de los primeros cambios requeridos para que el espermatozoide de los mamíferos inicie y culmine su capacitación.

## CONCLUSIONES

1. Los espermatozoides de cuyo extraídos de los conductos deferentes, lavados (2X) e incubados en NaCl 154 mM (37°C) hasta por 5 min; presentaron una concentración de AMPc, que se denominó basal, de  $2.72 \text{ picomolas}/10^7$  células.
2. Los espermatozoides de cuyo incrementaron abruptamente su contenido de AMPc dentro de los primeros 30 seg de iniciada su incubación en un medio capacitante. La magnitud de este incremento fue variable entre un grupo de animales y otro.
3. El incremento del contenido de AMPc intraespermático fue dependiente de la composición del medio de incubación:
  - a) La presencia de glucosa en el medio indujo un incremento adicional en el contenido de AMPc de los espermatozoides, dentro de los primeros 30 seg de incubación
  - b) La elevación inicial del contenido de AMPc intraespermático parece ser independiente del  $\text{Ca}^{+2}$  exógeno
  - c) El incremento adicional del nivel de AMPc intraespermático, inducido por glucosa, fue dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$  exógeno
  - d) La síntesis de AMPc, en los espermatozoides de cuyo, parece requerir una concentración de  $\text{Na}^{+}$  extracelular mayor de 30 mM
4. La proporción de la población espermática que se capacitó dentro de los primeros 5 min de incubación, no fue significativamente

diferente entre los diferentes medios de incubación ensayados (MCM, Tyrode, NaCl-NaHCO<sub>3</sub>, NaCl-NaHCO<sub>3</sub>-EDTA, solos o adicionados de glucosa, papaverina o ambas), no obstante que el contenido inicial de AMPc intraespermático fue diferente entre ellos por la incubación en un medio o en otro

5. El número de espermatozoides que se capacitó en el medio MCM o en el medio MCM adicionado de glucosa, no fue significativamente diferente entre sí a los 5, 30 o 60 min de incubación; a pesar de que el contenido inicial de AMPc de los espermatozoides incubados en el medio suplementado con glucosa, fue mayor
6. Los espermatozoides de cuyo con una concentración de AMPc cercana al basal, dentro de los primeros 30 seg de incubación parecen no capacitarse ni a 5 ni a 15 min de incubación en un medio capacitante
7. Los espermatozoides de cuyo se inmovilizaron después de estar en contacto con la solución de NaCl 154 mM (37°C), por un período mayor de 50 min. Los gametos reactivaron su movilidad dentro de los primeros 2 min de haber ocurrido el incremento del contenido de AMPc intraespermático (a los 30 seg de iniciada la incubación en el medio capacitante)
8. La presencia de glucosa en el medio de incubación indujo un movimiento activo de vibración en los espermatozoides de cuyo, que se conservó aun después de ser transferidos a MCM. Este

movimiento no parece ser mediado por el incremento adicional de AMPc inducido por la glucosa

Estos resultados sugieren que el incremento del contenido de AMPc intracelular que se observa al inicio de la incubación de los espermatozoides de cuyo en un medio capacitante, parece no tener relación directa con su tiempo de capacitación. Parece ser que este incremento inicial del nivel de AMPc, activa los mecanismos del espermatozoide que le permiten adquirir la movilidad activa, requerida para la subsecuente fertilización del óvulo. Pero, la pregunta ¿La capacitación espermática se inicia por la participación de cierto nivel (umbral) de AMPc, o no es así?, queda abierta para subsecuentes investigaciones.

## REFERENCIAS

- Amann, R.P., Hay, S.R. and Hammerstedt, R.H. 1982. Yield characteristics, motility and cAMP content of sperm isolated from seven regions of ram epididymys. *Biol. Reprod.* 27: 723-733
- Ahkong, Q.F., Fisher, O., Tampion, W. and Lucy, J.A. 1975. Mechanics of cell fusion. *Nature (London)* 253: 194-195
- Ahuja, K.K. 1984. Lectin-coated agarose beads in the investigation of sperm capacitation in the hamster. *Developmental Biol.* 104: 131-142
- Austin, C.R. 1952. The capacitation of the mammalian sperm. *Nature (London)* 170: 366
- Austin, C.R. 1951. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Austr. J. Sci. Res. B.* 4: 581-596
- Austin, C.R. and Short, R.V. *Reproduction in mammals. Book I: Germ cells and fertilization.* Cambridge University Press. Second Edition. London, G.B. 1982. pp: 1-16, 63-140
- Bavister, D.B. 1980. Recent progress in the study of early events in mammalian fertilization. *Develop. Growth and Differ.* 22: 386-402
- Bearer, E.L. and Friend, D.S. 1982. Modifications of anionic-lipid domains preceding membrane fusion in guinea pig sperm. *J. Cell Biol.* 92: 604-615

- Bearer, E.L. and Friend, D.S. 1981. Maintenance of lipid domains in guinea-pig sperm membranes. *J. Cell Biol.* 91: 266a (abstr).
- Bedford, J.M. 1970. Sperm capacitation and fertilization in mammals. *Biol. Reprod. Suppl.* 2: 128-158
- Bedford, J.M., Moore, H.P.N. and Franklin, L.E. 1979. Significance of the equatorial segment of the acrosome of the spermatozoon in eutherian mammals. *Exptl. Cell Res.* 119: 119-126
- Bellvé, A.R. and O'Brien, D.A. 1983. The mammalian spermatozoon. In: *Mechanism and control of animal fertilization.* Hartmen, J. F. ed. Academic Press, USA
- Berger, T. and Clegg, E.D. 1977. Effect of female reproductive tract secretions on adenyl cyclase and phosphodiesterase of porcine sperm. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 9: 759
- Berger, T. and Clegg, E.D. 1983. Adenylate cyclase activity in porcine sperm in response to female reproductive tract secretions. *Gamete Res.* 7: 169-177
- Bhatnagar, S.K. and Anand, S.R. 1982. Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity in mid piece and tail of buffalo spermatozoa and its role in sperm motility. *Biochim. Biophys. Acta* 716: 133-139
- Brackett, B.G. and Oliphant, G. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol. Reprod.* 12: 260-274
- Brand, H. and Hoskins, D.D. 1980. A cAMP-dependent phosphorylated motility protein in bovine epididymal sperm. *J. Biol. Chem.* 255: 982-987
- Braun, T. 1975. The effect of divalent cations on bovine spermatozoal adenylate cyclase activity. *J. Cyclic Nucleotide*

- Res. 1: 271-281
- Braun, T. and Dods, R.F. 1975. Development of an  $Mn^{2+}$  sensitive, soluble adenylate cyclase in rat testis. Proc, Natl. Acad. Sci. USA 72: 1097-1101
- Browder, L.W. 1980. Developmental biology. Saunders College, Philadelphia, USA 1980
- Case, R.M. 1984. The role of  $Ca^{2+}$  stores in secretion. Secretion: Mechanisms and Control. Case, Lingard and Young eds. Manchester University Press. 1984. pp: 149-167
- Casillas, E.R. and Hoskins, D.D. 1971. Adenyl cyclase activity and cyclic 3',5', AMP content of ejaculated monkey spermatozoa: Arch. Biochem. Biophys. 147: 148
- Casillas, E.R. and Hoskins, D.D. 1970. Activation of monkey spermatozoal adenyl cyclase by thyroxine and triiodothyronine. Biochem. Biophys. Res. Commun. 40: 255-262
- Chang, M.C. 1984. The meaning of sperm capacitation. A historical perspective. J. Androl. 5: 45-50
- Chang, M.C. 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the falopian tubes. Nature (London) 168: 697-698
- Chan S.Y., Lang, L.C.H. and Ma, H.K. 1983. Stimulation of the human spermatozoal fertilizing ability by dibutyryl 3',5'-cAMP and thoephilline *in vitro*. Archs, Androl. 11: 19-29
- Charles, M.A., Laweck, J., Pictet, R. and Grodsky, G.M. 1975. Insulin secretion. Interrelationships of glucose, cyclic adenosine 3':5'-monophosphate and calcium. J. Biol. Chem. 250: 6131-6140

- Chaundhry, A.S. and Amand, S.R. 1975. Enzyme activities regulation adenosine 3',5'-cyclic monophosphate of buffalo, bull and goat spermatozoa. *Indian J. Biochem. Biophys.* 12: 290-291
- Cheng, C.Y. and Boettcher, B. 1981. Partial characterization of human spermatozoal phosphodiesterase and adenylatecyclase and the effect of steroids on their activities. *Int. J. Androl.* 5: 253-266
- Cheng, C.Y. and Boettcher, B. 1979. Effects of cholera toxin and 5'-guanylylimidodiphosphate on human spermatozoal adenylate cyclase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 91: 1
- Christen, R., Schakmann, R.W. and Shaaro, B.M. 1982. Elevation of the intracellular pH activates respiration and motility of sperm of the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *J. Biol. Chem.* 257: 14881-14890
- Chulavatnatol, M., Panyim, S. and Wittsuwannakul, D. 1982. Comparison of phosphorylated proteins in intact rat spermatozoa from caput and cauda epididymidis. *Biol. Reprod.* 20: 197-207
- Clegg, E.D. Mechanisms of mammalian sperm capacitation. In: *Mechanisms and control of animal fertilization*. Hartmen, ed. Academic Press, USA. 1983. pp: 178-206
- Coelingh, J.P., Monfoort, C.H., Rozijn, T.H., Leoven, J.A.G., Schiphof, R., Steyn-Parve, E.P., Braunitzer, G., Schrank, B. and Ruhfus, A. 1972. The complete amino acid sequence of the basic nuclear

- protein of bull spermatozoa. *Biochem. Biophys. Acta* 285: 1-14
- Cornett, L. and Meizel, S. 1977. Catecholamines stimulate acrosome reactions of hamster sperm. *J. Cell Biol.* 75: 164
- Cornett, L. and Meizel, S. 1978. Stimulation of *in vitro* activation and the acrosome reaction of hamster spermatozoa by catecholamines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 4954-4958
- Dan, J.C. 1952. Studies on the acrosome. I. Reaction to egg-water and other stimuli. *Biol. Bull. (Woods Hole, Mass.)* 103: 54-61
- Dan, J.C. 1954. Studies on the acrosome II. Effect of calcium deficiency. *Biol. Bull. (Woods Hole, Mass.)* 107: 335-349
- Dan, J.C. 1956. The acrosome reaction. *Int. Rev. Cytol.* 5: 365-393
- Davis, B.K., Byrne, R. and Bedigian, K. 1980. Studies on the mechanism of capacitation: albumin-mediated changes in plasma membrane lipids during *in vitro* incubation of rat sperm cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 1546-1550
- Davis, B.K., Bryne, R. and 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, B.K. 1981. Timing of fertilization in mammals sperm cholesterol phospholipid ratio as a determinant of the capacitation internal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 7560-7564
- Dedman, J.R. The role of calmodulin in the mediation of intracellular calcium. Mechanisms of intestinal electrolyte

- transport and regulation by calcium. Alan R. Liss, Inc. 1984.  
pp: 135-146
- De Mayo, F.J., Mizoguchi, H. and DuKelow, W.R. 1980. Fertilization of squirrel monkey and hamster ova in the rabbit oviduct (Venogenous fertilization). *Science* 208: 1468-1469
- Dunbar, B.S. and Wolgemuth, D.J. Structure and function of the mammalian zona pellucida, a unique extracellular matrix. *Modern Cell Biol.* 3: 77-111. Alan R. Liss, Inc., N.Y. USA. 1984
- Edwards, R.G. Fertilization. In: Conception in the human female. Academic Press. 1980. pp: 573-651
- Erickson, R., Butley, M.S., Martin, S.R. and Betlach, Ch.J. 1979. Variation among in bred strains of mice in adenosine 3',5'-cyclic monophosphate levels of spermatozoa. *Genet. Res. Camb.* 33: 129-136
- Fabro, O., Juchum, A., Balerna, M., Campana, A. and Eppenberger, V. 1982. Cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinases of human seminal plasma: origin and characteristics of multiple form. *Biol. Reprod.* 27: 159-168
- Fawcett, D.W. Cell Biology and the population problem. 1978
- Fawcett, D.W. 1975. The mammalian spermatozoon. Review article. *Develop. Biol.* 44: 394-436
- Fraser, L.R. 1979. Accelerated mouse sperm penetration *in vivo* in the presence of caffeine. *J. Reprod. Fert.* 57: 377-384
- Fraser, L.R. 1981. Dibutyryl cyclic AMP decreases capacitation time *in vitro* in mouse spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 62:

63-72

- Freedman, M.F. and Kopf, G.S. 1985. Characterization of a seminal plasma-associated inhibitor of human seminal plasma protein kinase. *Biol. Reprod.* 32: 322-332
- Frenkel, G., Peterson, R.N. and Freund, M. 1973. The role of adenine nucleotides and the effect of caffeine and dibutyryl cyclic AMP on the metabolism of guinea pig epididymal spermatozoa. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 144: 420-425
- Friend, D.S. Freeze-fracture alterations in guinea-pig sperm membranes preceding gamete fusion. In: *Mechanism of mammalian sperm capacitation*. Clegg, E.D. ed. 1983.
- Friend, D.S. and Orci, L. Perrelet, A. and Yanagimachi, R. 1977. Membrane particle changes attending the acrosome reaction in guinea-pig spermatozoa. *J. Cell Biol.* 74: 561-577
- Friend, D.S. and Fawcett, D.W. 1974. Membrane differentiations in freeze-fractured mammalian sperm. *J. Cell Biol.* 63: 641-664
- Gaastra, W., Lukkes-Hofstra, J. and Konk, A.H.S. 1978. Partial covalent structure of two basic chromosomal proteins from human spermatozoa. *Biochem. Genet.* 16: 526-529
- Garbers, D.L., First, N.L. and Lardy, H.A. 1973. Properties of adenosine 3',5'-monophosphate dependent protein kinases isolated from bovine epididymal spermatozoa. *J. Biol. Chem.* 248: 875-879
- Garbers, L.D. and Kopf, G.S. 1980. The regulation of spermatozoa by calcium and cyclic nucleotides. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 13: 251-306

- Garbers, D.L., Kopf, G.S., Tubb, O.J. and Olson, G. 1983. Elevation of sperm adenosine 3':5'-monophosphate concentrations by a fucose-sulfate-rich complex associated with eggs: I Structural characterization. *Biol. Reprod.* 29: 1211-1220
- Garbers, D.L., Lust, W.D., First, N.L. and Lardy, H.A. 1971. Effects of phosphodiesterase inhibitors and cyclic nucleotides on sperm respiration and motility. *Biochem.* 10: 1825-1831
- Garbers, D.L., Tobb, A.J. and Hyne, R.V. 1982. A requirement of bicarbonate for  $Ca^{2+}$ -induced elevations of cyclic AMP in guinea pig spermatozoa. *J. Biol. Chem.* 257: 3980-3984
- Garbers, D.D., Tobb, J. and Kopf, G.S. 1980. Regulation of sea urchin-sperm cyclic AMP-dependent protein kinases by an egg-associated factor. *Biol. Reprod.* 22: 526-532
- Gorus, F.K., Finsky, R. and Pipeleers, D.G. 1982. Effect of temperature, nutrients, calcium and cAMP on motility of human spermatozoa. *Am. J. Physiol.* 242: c304-c311
- Gray, J.P., Drummond, G.I., Lok, D.W.T., Hadman, J.G. and Sutherland, E.W. 1976. Enzymes of cyclic nucleotide metabolism in invertebrate and vertebrate sperm. *Arch. Biochem. Biophys.* 172: 20-30
- Green, D.P.L. 1978. The activation of proteolysis in the acrosome reaction of guinea-pig sperm. *J. Cell Sci.* 32: 153-164
- Green, D.P.L. 1982. The course of the acrosome reaction in guinea-pig sperm. *J. Cell Sci.* 54: 161-171
- Haesungcharern, A. and Chulavatnatol, M. 1978. Inhibitors of

- adenylate cyclase from ejaculated human spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 53: 56-61
- Hamner, C.E. and Williams, W.L. 1963. Effect of the female reproductive tract on sperm-metabolism in rabbit and fowl. *J. Reprod. Fert.* 5: 143-150
- Hanada, A. and Chang, M.C. 1972. Penetration of zona-free eggs by spermatozoa of different. *Biol. Reprod.* 6: 300-309
- Herman, C.A., Zanler, W.L., Doak, G.A. and Campbell, R.J. 1976. Bull sperm adenylate cyclase: localization and partial characterization. *Arch. Biochem. Biophys.* 177: 622-629
- Hernández-Montes, H., Iglesias, G. and Mújica, A. 1973. Selective solubilization of mammalian spermatozoa structure. *Exptl. Cell Res.* 76: 437-440
- Hicks, J.J., Pedren, N. and Rosado, A. 1972. Modifications of human spermatozoa glycolysis by cyclic adenosine monophosphate (cAMP), estrogens, and follicular-fluid. *Fert. Steril.* 28: 886-893
- Hidaka, H., Inagaki, M., Kawamoto, S. and Sasaki, Y. 1984. Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C. *Biochem.* 23: 5036-5040
- Hirao, Y. and Yanagimachi, R. 1978. Effects of various enzymes on the ability of hamster egg plasma membranes to fuse with spermatozoa. *Gamete Res.* 1: 3-12
- Homner, G.E. and Williams, W.L. 1964. Identification of sperm stimulating factor of rabbit oviduct fluid. *Proc. Soc. Exp.*

- Biol. Med. 117: 240-243
- Horowitz, J.A., Toeg, H.H. and Orr, G.A. 1984. Characterization and localization of cAMP-dependent protein kinases in rat caudal epididymal sperm. J. Biol. Chem. 259: 832-838
- Hoskins, D.D. 1974. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and protein kinase levels in developing bovine spermatozoa. J. Reprod. Fertil. 37: 131-133
- Hoskins, D.D. 1973. Adenine nucleotide mediation of fructolysis and motility in bovine epididymal spermatozoa. J. Biol. Chem. 248: 1135-1140
- Hoskins, D.D., Brand, H. and Acott, T.S. 1978. Initiation of sperm motility the mammalian epididymis. Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 37: 2534-2542
- Hoskins, D.D., Casillas, E.R. and Stephens, D.T. 1972. Cyclic AMP-dependent protein kinase and of bovine epididymal spermatozoa. Biochem. Biophys. Res. Commun. 48: 1331-1338
- Hoskins, D.D., Hall, M.L. and Musterman, D. 1975. Induction of motility immature bovine spermatozoa by cyclic AMP phosphodiesterase inhibitors and seminal plasma. Biol. Reprod. 13: 168-176
- Hoskins, D.D., Stephens, D.T. and Casillas, E.R. 1970. Enzymic control of fructolysis in primate spermatozoa. Biochem. Biophys. Acta 237: 227-238
- Hoskins, D.D., Stephens, D.T. and Hall, M.L. 1974. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and protein kinase levels in developing

- bovine spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 37: 131-133
- Hoskins, D.D., Acott, T.S., Chitchlow, L. and Vijayaraghavan, S. 1983. Studies on the roles of cyclic AMP and calcium in the development of bovine sperm motility. *J. Submicrosc. Cytol.* 15: 21-27
- Huacuja, L., Delgado, N.M., Merchant, H., Pancardo, R.M. and Rosado, A. 1977. Cyclic AMP induced incorporation of  $^{33}\text{Pi}$  into human spermatozoa membrane components. *Biol. Reprod.* 17: 89-96
- Hyne, R.V. and Garbers, D.L. 1979a. Regulation of guinea pig sperm adenylate cyclase by calcium. *Biol. Reprod.* 21: 1135-1142
- Itoh, H. and Hidaka, H. 1984. Direct interaction of calmodulin antagonists with  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase. *J. Biochem.* 96: 1721-1726
- Jakobs, K.H. Minoth, M. and Aktories, K. 1984. Sodium regulation of hormone-sensitive adenylate cyclase. *J. Receptor Res.* 4: 443-458
- Jiang, C.S., Kilfeather, S.A., Fearson, R.M. and Turner, P. 1984. The stimulatory effects of caffeine, theophylline, lysinetheophylline and 3-isobutyl-1-methylxanthine on human sperm motility. *Br. J. Clin. Pharmac.* 18: 258-262
- Jones, H.P., Lenz, R.W., Palevitz, B.A. and Cornier, M.J. 1980. Calmodulin localization in mammalian spermatozoa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 2772-2976
- King, M.M. and Huang, Ch.Y. 1984. The calmodulin-dependent activation and deactivation of the phosphoprotein phosphatase,

- calcineurin, and the effect of nucleotides, pyrophosphate, and divalent metal ions. *J. Biol. Chem.* 259: 8847-8856
- Kinsey, W.H., Rubin, T.H. and Lennarz, W.J. 1980. Studies on the specificity of sperm binding in echinoderm fertilization. *Dev. Biol.* 74: 246-250
- Kistler, W.S., Keim, P.S. and Heinrichson, R.L. 1976. Partial structural analysis of the basic chromosomal protein of rat spermatozoa. *Biochim. Biophys. Acta* 427: 752-757
- Klee, C.B. and Newton, D.L. Positrontransational covalent modifications of proteins. Academic Press, Inc. USA. 1983. pp. 61-80
- Koehler, J.K. 1976. Changes in antigenic site distribution on rabbit spermatozoa after incubation in capacitating media. *Biol. Reprod.* 15: 444-456
- Kolk, A.H.J. and Samuel, T. 1975. Isolation, chemical and immunological characterization of two strongly basic nuclear proteins from human spermatozoa. *Biochim. Biophys. Acta* 393: 307-319
- Kopf, G.S. and Vacquier, V.D. 1984. Characterization of a calmodulin-stimulated adenylate cyclase from abalone spermatozoa. *J. Biol. Chem.* 259: 7590-7596
- Lee, M.Y.W. and Iverson, R.M. 1976. An adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase from sea urchin spermatozoa. *Biochem. Biophys. Acta* 429: 123-136

- Li, T.K. 1972. Stimulation of endogenous respiration of ejaculated ram sperm by dibutyryl cyclic AMP. *Life Sci.* 11: PII, 938-948
- Llanos, M.N. and Meizel, S. 1983. Phospholipid methylation increases during capacitation of golden hamster sperm *in vitro*. *Biol. Reprod.* 28: 1043-1056
- Lindeman, C.B. 1978. A cAMP-induced increase in the motility of demembrated bull sperm models. *Cell* 13: 9-18
- Litvin, Y., Pasmantier, R., Fleischer, N. and Erlichman, J. 1984. Hormonal activation of the cAMP dependent protein kinases in atT10 cells. *J. Biol. Chem.* 259: 10296-10302
- Majunder, C.G. 1981. Enzymatic characteristics of an ecto-cyclic AMPc-dependent protein kinase in rat epididymal spermatozoa. *Biochem. J.* 159: 111-117
- Malaisse, W.J. and Malaisse-Lagae, F. 1984. The role of cyclic AMP in insulin release. *Experientia* 40: 1067-1095
- Mann, T. and Lutwak-Mann, C. Male reproductive function and semen. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, New York. 1981. pp: 1-28, 55-63, 83-106, 139-156, 258-268
- Means, A.R., Lagace, L., Guerriero, V. Jr. and Chafouleas, J.G. 1982. Calmodulin as a mediator of hormone action and cell regulation. Evolution of hormone-receptor systems. *J. Cell Biochem.* 20: 317-330
- Meizel, S. The mammalian sperm acrosome reaction, a biochemical approach. In: Development in mammals. Johnson, M.H. ed. Amsterdam, New York, Oxford, 1978

- Mita, M. and Yamamasu, I. 1984. The role of external potassium ion in activation of sea urchin spermatozoa. *Develop. Growth and Differ.* 26: 484-495
- Moore, H.D. and Bedrord, J.M. Interaction of mammalian gametes in the female. In: *Mechanisms and control of animal fertilization.* Hartman, D. ed. Academic Press, USA. 1983
- Moreno-Rodríguez, R.A. 1985. ¿Modula la glucosa el contenido de AMP cíclico en los espermatozoides de cuyo? Tesis para obtener el grado de M. en C. CINVESTAV, México
- Morisawa, M. and Okuno, M. 1982. Cyclic AMP induces maturation of trout sperm axoneme to initiate motility. *Nature* 295: 703-704
- Morton, D.B. 1985. Acrosomal enzymes: immunochemical localization of acrosin and hyaluronidase in ram spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 45: 373-378
- Morton, B. and Albagli, L. 1973. Modification of hamster sperm adenylyl cyclase by capacitation *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 50: 697-703
- Morton, B., Harrigan-Lun, J., Albagli, L. and Jooss, T. 1974. The activation of motility in quiescent hamster sperm from the epididymis by calcium and cyclic nucleotides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 56: 372-378
- Mrsny, R.J. and Meizel, S. 1979. Evidence suggesting a role for cyclic nucleotides in hamster sperm activation and acrosome reaction. *Fed. Proc.* 38: 230

- Mrsny, R.J. and Meizel, S. 1980. Evidence suggesting a role for cyclic nucleotides in acrosome reaction of hamster sperm *in vitro*. J. Exp. Zool. 210: 123-128
- Mújica de Hernández, A. 1979. Estudios sobre el espermatozoide humano eyaculado. Localización y síntesis de sus proteínas. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias en el CINVESTAV-IPN. México
- Mújica, A. and Valdés, R.M.A. 1983. On the role of glucose in capacitation and acrosomal reaction of guinea pig sperm. Gamete Res. 8: 335-344
- Myles, D.G., Primakoff, P. and Bellvé, A.R. 1981. Surface domains of the guinea pig sperm defined with monoclonal antibodies. Cell 23: 433-439
- Nadijcka, M. and Hillman, N. 1980. Differences in cAMP levels in  $t^h$ - and Non  $t^-$ -bearing mouse spermatozoa. Biol. Reprod. 22: 1102-1105
- Noland, T.D., Olson, G.E. and Garbers, D.L. 1983. Purification and partial characterization of plasma membranes from the bovine epididymal spermatozoa. Biol. Reprod. 29: 987-998
- Noland, T.D., Olson, G.E. and Garbers, D.L. 1984. Protein phosphorylation of plasma membranes from bovine epididymal spermatozoa. Biol. Reprod. 31: 185-194
- Oko, R. and Hrudka, F. 1982. Segmental aplasia of the mitochondrial sheath and sequelae induced by gossypol in rat spermatozoa. Biol. Reprod. 26: 183-195

- Oliphant, G. 1976. Removal of sperm-bound seminal plasma components as a prerequisite to induction of the rabbit acrosome reaction. *Fertil. Steril.* 27: 28-38
- Oliphant, G. and Brackett, B.G. 1973. Immunological assessment of surface change of rabbit sperm undergoing capacitation. *Biol. Reprod.* 9: 404-414
- O'Rand, M.G. 1977. Restriction of a sperm surface antigen's motility during capacitation. *Dev. Biol.* 55: 260-270
- O'Rand, M.G. 1979. Changes in sperm surface properties correlated with capacitation in the spermatozoon. (Edited by Fawcett, D.W. and Bedford, J.M.). Urban and Schwarzenberg, Baltimore-Munich. pp: 195-204
- Papahadjopoulos, D. 1978. Calcium induced phase changes and fusion in natural and model membranes. *Cell Surf. Rev.* 5: 765-790
- Pastan, J. 1972. This comparatively small molecule is a "second messenger" between a hormone and its effects within the cell. It operates in cells as diverse as bacteria and cancerous animal cells. *Sci. Am.* 227: 97-105
- Perreault, S.A. and Rogers, B.J. 1982. Relationship between fertilizing ability and cAMP in human spermatozoa. *J. Androl.* 3: 396-401
- Peterson, R.N., Russell, L., Bundman, D. and Freund, M. 1978. Presence of microfilaments and tubular structures in boar spermatozoa after chemically inducing the acrosome reaction.

- Biol. Reprod. 19: 459-466
- Pollard, H.B. and Weingrand, D. 1976. A new, rapid method for measuring multiple samples of cyclic AMPc using TEAE cellulose column chromatography and a specific binding protein. Anal. Biochem. 76: 382-384
- Preckumar, E. and Bhargava, P.N. 1972. Transcription and translation in bovine spermatozoa. Nature 240: 139-143
- Raphaeli, A. and Parsons, S.M. 1982. Calmodulin stimulation of  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  transport and protein phosphorylation in cholinergic synaptic vesicles. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 5783-5787
- Reger, J.F., Fain-Maurel, M.A. and Dadoone, J.P. 1985. A freeze-fracture study on epididymal and ejaculate spermatozoa of the monkey (*Macaca fascicularis*). J. Submicrosc. Cytol. 170: 49-52
- Reyes, A., Goicoechea, B. and Rosado, A. 1978. Calcium ion requirement for rabbit spermatozoal capacitary and enhancement of fertilizing ability by ionophore A-23187 and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. Fert. Steril. 29: 451-455
- Rogers, A. and Garcia, L. 1979. Effect of cAMP on acrosome reaction and fertilization. Biol. Reprod. 21: 365-372
- Rogers, B.J., Ueno, M. and Yanagimachi, R. 1981. Fertilization by guinea pig spermatozoa requires potassium ions. Biol. Reprod. 25: 689-648
- Rogers, J. and Yanagimachi, R. 1975. Retardation of guinea pig sperm acrosome reaction by glucose. The possible importance of pyruvate and lactate metabolism in capacitation and acrosome

- reaction. Biol. Reprod. 13: 568-573
- Rosado, A., Hicks, J.J., Reyes, A. and Blanco, I. 1974. Capacitation *in vitro* of rabbit spermatozoa with cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and human follicular fluid. Fert. Steril. 25: 821-824
- Rosen, O.M., Erlichman, J. and Rubin, C.S. 1975. Molecular structure and characterization of bovine heart protein kinase. Adv. Cyclic Nucleotide Res. 5: 253-263
- Ross, E.M. and Gilman, A.G. 1980. Biochemical properties of hormone-sensitive adenylate cyclase. Ann. Rev. Biochem. 49: 533-564
- Saling, P.M. and Bedford, J.M. 1981. Absence of species specificity for mammalian sperm capacitation *in vivo*. J. Reprod. Fertil. 63: 119-123
- Schmell, E.D., Gulyas, B.J. and Hedrick, J.L. E99 surface changes during fertilization. In: Mechanisms and control of animal fertilization, Hartman, D. ed., Academic Press, USA. 1983. p: 365-403
- Schoff, P.K., Forrester, I.T., Haley, B.E. and Atherton, R.W. 1982. A study of cAMP binding proteins on intact and disrupted sperm cells using 8-azidoadenosine 3',5'-cyclic monophosphate. J. Cell Biochem. 19: 1-15
- Schwarz, M.A. and Koehler, J.K. 1979. Alteration in lectin binding to guinea pig spermatozoa accompanying *in vitro* capacitation and the acrosomal reaction. Biol. Reprod. 21: 1295-1307

- Shalgi, R. and Phillips, D.M. 1982. Sperm penetration into rat ova fertilized *in vitro*. J. Androl. 3: 382-387
- Singht, J.P., Babcock, D.F. and Lardy, H.A. 1978. Increased calcium-ion influx is a component of capacitation of spermatozoa. Biochem. J. 172: 549-556
- Soucek, D.A. and Vary, J.C. 1984. Some properties of acid and alkaline phosphates from boar sperm plasma membranes. Biol. Reprod. 31: 689-693
- Spiegel, R.M. Estadística. Mc Graw Hill, México. 1961. pp: 84, 188, 192-195
- Stackpole, C.W. and Devorkin, D. 1974. Membrane organization in mouse spermatozoa revealed by freeze-etching. J. Ultrastruct. Res. 49: 167-187
- Stambaugh, R. 1978. Enzymatic and morphological events in mammalian fertilization. Gamete Res. 1: 65-85
- Stambaugh, R. and Smith, M. 1978. Tubular and microtubule-like structures in mammalian acrosome. J. Exp. Zool. 203: 135-141
- Stein, D.M. and Fraser, L.R. 1984. Cyclic nucleotide metabolism in mouse epididymal spermatozoa during capacitation *in vitro*. Gamete Res. 10: 283-299
- Steinberg, R.A. 1984. Homology between regulatory subunits of type I cyclic AMP-dependent protein kinases from bovine and murine cells. Arch. Biochem. Biophys. 234: 546-551
- Steinhadt, R.A. and Alderton, J.M. 1982. Calmodulin confers calcium sensitive on secretory exocytosis. Nature (London) 295: 154-155

- Storey, B.T. and Kyhani, E. 1974. Energy metabolism of spermatozoa. II. Comparison of pyruvate and fatty acid oxidation by mitochondria of rabbit epididymal spermatozoa. *Fertil. Steril.* 75: 857-864
- Summers, R.G. and Hylander, B.L. 1976. Primary gamete binding. Quantitative determination of its specificity in echinoid fertilization. *Exp. Cell Res.* 100: 190-194
- Summers, R.G., Tolbot, P., Keough, E.M., Hylander, B.L. and Franklin, L.E. 1976. Ionophore A-23187 induces acrosomal reaction in sea urchin and guinea pig spermatozoa. *J. Exp. Zool.* 196: 381-385
- Swarup, G. and Garbers, D.L. 1982. Phosphoprotein phosphate activity of sea urchin spermatozoa. *Biol. Reprod.* 26: 953-960
- Takei, G.H., Fleming, A.D. and Yanagimachi, R. 1984. Phospholipids in guinea pig spermatozoa before and after capacitation *in vitro*. *Andrologia* 16: 38-47
- Talbot, P. Events leading to fertilization in mammals. In: *Fertility and sterility*. Harrison, R.F., Bonnar, J. and Thompson, W. eds. MTP Press Limited, USA. 1984
- Tang, F.Y. and Hoskins, D.D. 1975. Phosphoprotein phosphate of bovine epididymal spermatozoa. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 62: 328-355
- Tash, J.S., Kakan, S.S. and Means, A.R. 1984. Flagellar motility requires the cAMP-dependent phosphorylation of a heat-stable NP-40-soluble 56 kd protein, axokinin. *Cell* 38: 551-559
- Tash, J.S. and Means, A.R. 1982. Regulation of protein phosphoryla-

- tion and motility of sperm by cyclic adenosine monophosphate and calcium. *Biol. Reprod.* 26: 745-763
- Tash, J.S. and Means, A.R. 1983. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, calcium and protein phosphorylation in flagellar motility. *Biol. Reprod.* 28: 75-104
- Towns, K.M. and Luke, R.K.J. 1976. Measurement of adenylate cyclase activity in ram spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 47: 355-357
- Toyoda, Y. and Chang, M.C. 1974. Capacitation of epididymal spermatozoa in a medium with high K/Na ratio and cyclic AMP for the fertilization of rat eggs *in vitro*. *J. Reprod. Fert.* 38: 125-134
- Treetipsatit, N. and Chulavatnatol, M. 1982. Effects of ATP, cAMP and pH on the initiation of flagellar movement in demembrated models of rat epididymal spermatozoa. *Exp. Cell Res.* 142: 495-499
- Trosper, T.L. and Phillipson, K.D. 1984. Stimulatory effect of calcium chelators on  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchange in cardiac sarcolemmal vesicles. *Cell Calcium* 5: 211-222
- Turner, T.T. and Giles, R.D. 1982. The effects of cyclic adenine nucleotides, phosphodiesterase inhibitors, and cauda epididymal fluid on the motility of rat epididymal spermatozoa. *J. Androl.* 3: 134-139
- Vaidya, R.A., Glass, R.H., Dandekar, P. and Johnson, K. 1971. Decrease in the electrophoretic movility of rabbit spermatozoa

following intrauterine incubation, *J. Reprod. Fert.* 24: 299-301

Vigayaraghavan, S., Critchlow, L.M, and Hoskins, D.D. 1985.

Evidence for a role for cellular alkalinization in the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-mediated invitation of motility in bovine caput spermatozoa. *Biol. Reprod.* 32: 489-500

Wall, R.J., Jerrard, D.A., Arrish, J.J. and Foote, R.H. 1984.

Optimization of procedures for separation of motile and non-motile bull and rabbit spermatozoa with bovine sperm albumin gradients. *Gamete Res.* 10: 165-175

Wasco, W.M. and Orr, G.A. 1984. Function of calmodulin in mammalian

sperm: presence of a calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase associated with demembrated rat caudal epididymal sperm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 115: 636-642

Weinman, D.J. and Williams, W.L. 1962. Mechanism of capacitation

of rabbit spermatozoa. *Nature* 203: 423-424

Wilson, M.J., Steer, R.C. and Kaye, K.W. 1982. Presence and

characterization of two protein kinase activities in human seminal fluid. *Biochem. Biophys. Acta* 700: 206-212

Wilson, M.J. and Kaye, K.W. 1983. Tissue sources of protein

kinase activities in human seminal fluid: studies of normal, oligozoospermic, and vasectomized men. *Fertil. Steril.* 40: 105-109

Williams, W.L., Abney, T.D., Chernoff, H.N., Du Kelow, W.R. and

- Pinsker, M.C. 1967. Biochemistry and physiology of decapacitation factor. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 2: 11-23
- Wolgemoth, D.J. Synthetic activities of the mammalian early embryo: molecular and genetic alteration following fertilization. In: *Mechanisms and control of animal fertilization.* Hartman, J. ed. Academic Press, USA. 1983. pp: 415-445
- Yanagimachi, R. 1970. The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. *J. Reprod. Fert.* 23: 193-196
- Yanagimachi, R. 1984. Zona-free hamster eggs: their use in assessing fertilizing capacity and examining chromosome of human spermatozoa. *Gamete Res.* 10: 187-232
- Yanagimachi, R. and Usui, N. 1974. Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. *Exptl. Cell Res.* 84: 161-174
- Yeung, C.H. 1984. Effects of cyclic AMP on the motility of mature and immature hamster epididymal spermatozoa studied by reactivation of the demembrated cells. *Gamete Res.* 9: 99-114