



**Universidad Nacional Autónoma de México**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**PARTICIPACION DE LA ACTINA Y LA TUBULINA EN LA  
REACCION ACROSOMAL DEL ESPERMATOZOIDE DE  
MAMIFERO.**

**T E S I S**

Que para obtener el título de:

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P r e s e n t a :

**MARICELA LUNA MUÑOZ**

1982



Universidad Nacional  
Autónoma 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 esta 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.

## C O N T E N I D O

### I. INTRODUCCION.

Antecedentes y Generalidades

Hipótesis

Objetivo

Finalidad

### II. MATERIAL Y METODOS.

#### 1. Material

A) Biológico.

B) Químico

a) Sistema para inducir la reacción acrosomal.

b) Inhibidores de proteínas parecidas a actina y tubulina.

b.1 Citocalasina B

b.2 Colchicina

B.3 Vincristina

#### 2. Metodología.

### III. RESULTADOS.

### IV. DISCUSION.

### V. CONCLUSIONES.

### VI. RESUMEN.

### VII. BIBLIOGRAFIA.

I. INTRODUCCION

## INTRODUCCION

Después de la eyaculación el espermatozoide de mamífero requiere permanecer un determinado tiempo, tanto en la cavidad uterina (endometrio) como en el lumen de la trompa de Fallopio, para adquirir la habilidad de fertilizar al ovocito (1,2).

A este proceso se le denomina "capacitación", el cual se observa en todas las especies de mamíferos estudiadas hasta ahora, incluyendo al humano (3).

La capacitación incluye dos etapas secuenciales (4,5): la primera *in utero* se traduce en un incremento tanto en la actividad metabólica como en la movilidad del espermatozoide; expresados por un aumento en el consumo de oxígeno y de su actividad glicolítica, con la siguiente particularidad: utiliza preferentemente glucosa, tanto por la vía de Embden-Meyerhoff, como por la vía de las pentosas; vías importantes durante el transporte del espermatozoide en el tracto genital femenino (6,7). La segunda etapa, que se lleva a cabo en la trompa de Fallopio, implica cambios no solo en el estado energético de esta célula, sino también modificación de las características membranales del espermatozoide (fluidez, movilidad, etc) (8,9); aspectos que facilitan la fusión de las membranas plasmáticas y acrosomal externa, seguidas de la vesiculación de estas entidades durante la reacción acrosomal (Fig.1); eventos esenciales para la fertilización de la gameta homóloga (10,11).

Los cambios estructurales, metabólicos y de movilidad que experimenta el espermatozoide de mamífero durante este proceso han sido estudiados mediante la utilización de métodos biofísicos, tales como: fluorescencia (8,9), polarografía celular (12,13), espectrofotometría de infrarrojo (14), criofractura (10,15), microscopía electrónica (11), etc.

Se ha determinado que estos cambios están regulados por la composición bioquímica del microambiente, con el que el espermatozoide interacciona durante su transporte en el tracto genital femenino (16).

Ahora bien, durante la reacción acrosomal hay secreción y/o liberación de enzimas hidrolíticas ácidas (Tabla 1), que son necesarias para la penetración del espermatozoide a través de las diferentes capas que cubren al ovocito; es decir, *cumulus oophorus corona radiata* y zona pellucida (33,34,35).

La tendencia actual indica que este proceso es un evento organizado y secuencial, debido a que los grupos de Talbot (36), Mercado (37) y Stambaugh (38), han demostrado la liberación y/o secreción de hialuronidasa y acrosina por el espermatozoide metabólicamente activo (hamster, conejo y humano), durante el proceso de la capacitación *in vitro* y antes de la reacción acrosomal de estas células. Esto implica que los estudios realizados hasta ahora solo han sido enfocados a la expresión final y no a la dinámica de este proceso, como esta investigación bioquímica pretende.

El concepto de la secreción y/o liberación secuencial de las enzimas hidrolíticas ácidas acrosomales, así como las características histoquímicas y el origen de este organelo, han permitido señalar una extraordinaria similitud estructural y funcional entre el acrosoma, lisosomas y gránulos secretores (29,39). En estos dos últimos organelos tanto la liberación como la secreción, no solo de las enzimas hidrolíticas ácidas sino de otros componentes bioquímicos (sustratos, iones, hormonas, etc), están regulados fundamentalmente por calcio y nucleótidos cíclicos (AMPc\* y GMPc\*\*) tanto endógenos como exógenos (40,41).

Los nucleótidos cíclicos son segundos mensajeros íntimamente relacionados con el ensamble de microfilamentos y microtúbulos, estructuras que determinan la dinámica de estos procesos.

Los microfilamentos son estructuras fibrilares de aproximadamente 4-6 nm de diámetro, formados por monómeros de actina o proteínas similares a ésta, presentes en células superiores (42). Estas estructuras están participando en la determinación de la morfología y locomoción celular, así como en la organización del citoplasma, entre otras funciones celulares y algunos de ellos están insertados en la cara interna de la membrana plasmática (43,44).

El estudio de los mecanismos moleculares involucrados en el ensamble de estas estructuras, indica que este

\* AMPc = Adenosina 3', 5' Monofosfato.

\*\* GMPc = Guanosina 3', 5' Monofosfato.

proceso se lleva a cabo en dos etapas: condensación y polimerización, debido a la participación de dos tipos de actina: monómeros (actina G) y filamentos (actina F), secuencia de eventos que culminan con la elongación de los denominados microfilamentos (45). El planteamiento de estos mecanismos ha sido posible, en parte, debido a que tanto *in vivo* como *in vitro*, principios activos de Citocalasina B inhiben el ensamble de estas proteínas, uniéndose específicamente con actina F e inhibiendo la elongación de estas estructuras (45).

Por otra parte los microtúbulos son entidades formadas por subunidades globulares de tubulina  $\alpha$  y  $\beta$ , que al organizarse en 10-13 protofilamentos constituyen un centro de nucleación de estructuras oligoméricas, fase inicial del evento de elongación que culmina con la formación de microtúbulos, cuyo diámetro es de aproximadamente 24 nm, con un diámetro interior aproximado de 5 nm; estas entidades están localizadas intracelularmente en casi todas las células de eucariotes (46,47,48,49).

Los microtúbulos participan en diferentes funciones celulares: mantenimiento del citoesqueleto celular, movimientos cromosómicos durante la mitosis, secreción (proteínas, enzimas, sustratos, iones, etc) y movilidad celular (pseudópodos, cilios y flagelos) entre otras (48).

Los microtúbulos se han clasificado en estables y lábiles (48). Los lábiles están presentes en axones y dendritas del sistema nervioso central, aparato mitótico, gránulos secretores y en el citoplasma de células eucariotes. Por lo tanto, la tubulina se encuentra en equilibrio



dinámico con microtúbulos ensamblados, lo que hace que las células tengan la capacidad de regular la asociación y disociación de estas entidades, dependiendo de las necesidades fisiológicas celulares.

Por otra parte, los microtúbulos estables, presentes en cilios y flagelos, no parecen estar en equilibrio con tubulina citoplasmática libre. Estos pueden ser aislados como estructuras intactas y presentan las siguientes propiedades: no se despolimerizan a bajas temperaturas, altas presiones y agentes químicos (Colchicina y Vincristina), a diferencia de los microtúbulos lábiles, en donde es específica y selectiva la interferencia con el ensamble y dinámica de estas estructuras debido a los inhibidores antes señalados (46).

Es importante señalar que los microtúbulos han sido descritos en acrosomas de especies inferiores (*Nucella lapillus*, *Truncatella*, *Gerris remigis* (38), y por otra parte, se ha determinado histoquímicamente que la actividad de acrosina está unida a proteínas parecidas a tubulina en los acrosomas de espermatozoides de diferentes especies de mamíferos (38). Así mismo, la contractilidad de las estructuras acrosomales parecen estar determinadas por proteínas parecidas a actina. La presencia de estas proteínas ha sido detectada en la cabeza del espermatozoide de mamífero utilizando inmunofluorescencia indirecta (50).

Los datos anteriores permiten sugerir la existencia de sistemas lábiles de microtúbulos y microfilamentos en los acrosomas de mamíferos superiores, los que participan

en el proceso de secreción y/o liberación de enzimas durante la reacción acrosomal; pero debido a su labilidad aun no se han podido visualizar objetivamente, siendo por supuesto también necesario el determinar con precisión el momento en que se lleva a cabo el ensamble de estas estructuras.

HIPOTESIS.- Como se ha señalado, el acrosoma del espermatozoide de mamífero tiene características estructurales y funcionales similares a las de un gránulo secretor (29,39). A semejanza de lo estudiado en lisosomas (41,51) y gránulos secretores, proponemos la existencia de proteínas parecidas a actina y tubulina, integradas al ensamble y desensamble de microfilamentos y microtúbulos en la membrana plasmática y matriz acrosomal, respectivamente. Se piensa que estos componentes, acoplados, integran la dinámica de la reacción acrosomal y parecen estar regulados por calcio, magnesio y nucleótidos cíclicos (AMPc y GMPc) intra y extracelulares (3,16,40).

El OBJETIVO de este trabajo se orienta al estudio de la participación de microfilamentos y microtúbulos en la dinámica de la reacción acrosomal del espermatozoide de mamífero, mediante la utilización de inhibidores específicos para estas estructuras: Citocalasina B para microfilamentos, Colchicina y Vincristina para microtúbulos; con la FINALIDAD de que los resultados de este estudio ayuden a esclarecer los mecanismos moleculares que inician y regulan la reacción acrosomal, lo que potencialmente contribuirá a diseñar una estrategia más racional para regular la fertilidad humana.

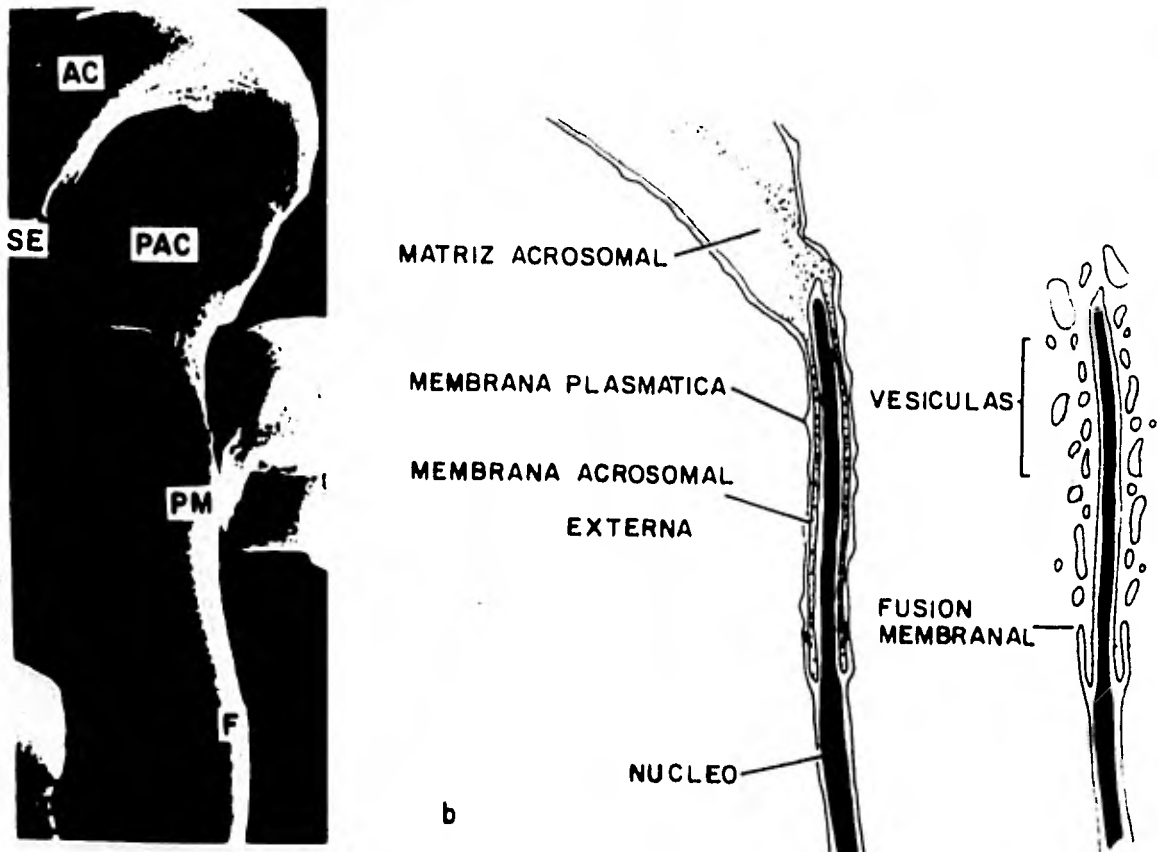


Fig.1 ESTRUCTURA DEL ESPERMATOZOIDE DE COBAYO.

a) En esta microfotografía electrónica de barrido de un - espermatozoide de cauda de epidídimo (cobayo), se observan sus componentes estructurales: región acrosomal (AC), segmento ecuatorial (SE), pieza media (PM), y flagelo (F) - (X 5000). b) Diagrama esquemático del espermatozoide de - cobayo antes y después de la reacción acrosomal, en el que se observa sus membranas plasmática y acrosomal externa, - matriz acrosomal y núcleo, así como diferentes cambios morfológicos que sufren sus entidades membranales (fusión de membranas y vesiculación) durante este proceso.

Modificación de Friend y col (10).

## TABLA 1

ENZIMAS HIDROLITICAS ACIDAS LIBERADAS Y/O SECRETADAS  
 DURANTE LA REACCION ACROSOMAL DEL ESPERMATOZOIDE -  
 DE DIFERENTES ESPECIES DE MAMIFEROS.

ENZIMAS	REFERENCIAS
Hialuronidasa	Austin, 1960 (17). Gould y Bernstein, 1973(18) Stambaugh y Buckley, 1969 (19)
Acrosina	Schill y Fritz, 1975 (20) Stambaugh y Buckley, 1969, 1972 (21). Zaneveld y col., 1972 (22) Morton y col.,1975 (23) Garner y col., 1977 (24)
Proacrosina	Meizel, 1978 (16) Schleuning y col., 1976 (25)
Estearasa	Bryan y Unnithan,1973 (26)
Neuraminidasa	Srivastava y col., 1970 - (27)

cont.

Fosfatasa ácida	Hartree, 1977 (28) Maizel, 1978 (16)	
Fosfolipasa A	Allison y Hartree, 1970 (29)	-
Arilsulfatasa	Allison y Hartree, 1970 (29)	-
N-Acetilglucosaminidasa	Couchie y Mann, 1957 (30)	
Aril-aminidasa	Meizel y Colham, 1972 (31)	
Proteinasas ácidas	Allison y Hartree, 1972 (29)	-
Colagenasa	Koren y Milkovic, 1973 (32)	

II. MATERIAL Y METODOS.

## I. MATERIAL

## A. BIOLÓGICO.

Se utilizaron 40 cobayos machos de la cepa Hartley, adultos de 4-10 meses de edad, pesando 800-900 g, todos - ellos de fertilidad comprobada; éstos se mantuvieron con - un fotoperíodo de 10:14 h., a una temperatura de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , con agua y purina *ad libitum*.

## B. QUÍMICO.

## a.- Sistema para inducir la reacción acrosomal.

Medio Capacitante mínimo	(MCM) *
NaCl	102.0 mM
CaCl <sub>2</sub>	1.15 mM
NaHCO <sub>3</sub>	25.0 mM
CH <sub>3</sub> -CO-COONa	1.0 mM
CH <sub>3</sub> -CHOH-COONa	20.0 mM
Osmolaridad	306 mosm/kg
pH	7.4

Los reactivos utilizados fueron de grado analítico y se obtuvieron de las casas Sigma Chemical Co. y Merck - Darmstadt.

\* Barros, 1974 (52).

b.- Inhibidores de proteínas parecidas a actina y tubulina.

Seleccionamos los siguientes compuestos para interferir con el ensamble y desensamble de microfilamentos y - microtúbulos, debido a que poseen una alta especificidad y los mecanismos moleculares de su interacción están planteados y prácticamente elucidados (53,54,55).

**MICROFILAMENTOS:**

Citocalasina B (Aldrich Chemical Co., Inc.)

**MICROTUBULOS:**

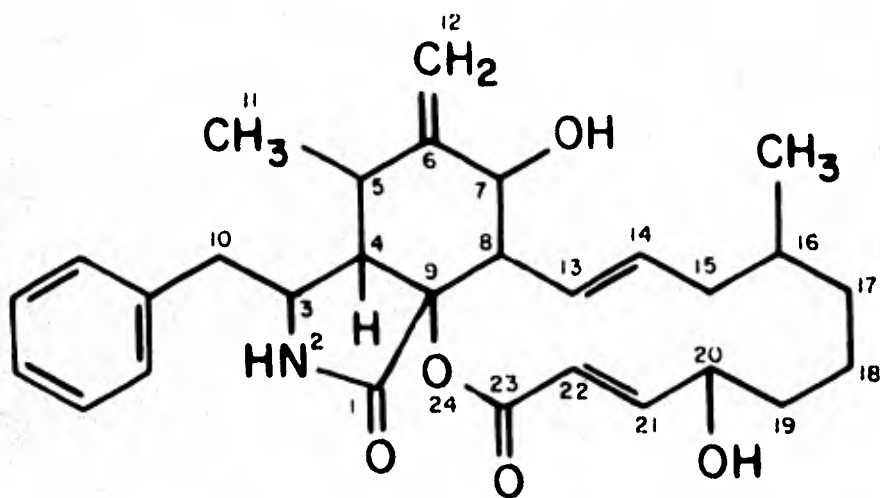
Colchicina (Merck, Darmstadt)

Vincristina (Sulfato de Vincristina, Eli Lilly & Co.)



## b.1.- CITOCALASINA B

Nombre sistemático	(7S, 16R, 20R)-7,20-dihidroxi-16-metil-10-fenil-24-oxa- $\lambda^4$ -citocalasa-6(12)-13(E)-trien-1,23-diona.
Fórmula condensada	$C_{29}H_{37}NO_5$
Peso molecular	479
Rotación óptica	$[\alpha]_D + 83^\circ$
Solubilidad	metanol
Estructura	



La Citocalasina B es un subproducto del metabolismo de diferentes géneros de Deuteromicetos (56,57,58).

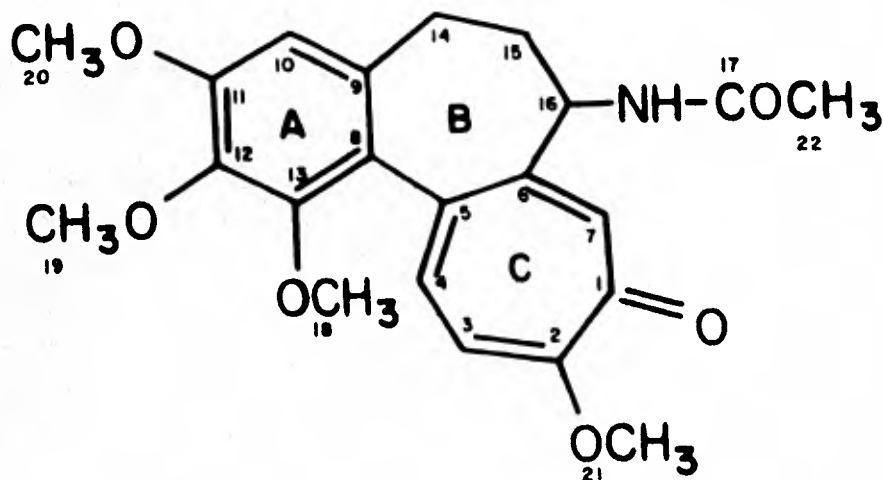
## MECANISMOS DE ACCION PROPUESTOS

La Citocalasina B está constituida por un grupo - perhidroisoindol fusionado a un macrociclo que incluye: - un anillo  $\gamma$ -lactama, dos dobles enlaces disustituídos en posición trans y un grupo hidroxilo en C-20 (57). Es importante señalar que la actividad biológica de Citocalasina B depende, principalmente, de la integridad de este macrociclo así como de los sustituyentes hidroxilo en C-20 y el grupo carbonilo en C-23 (59).

Se ha establecido que Citocalasina B se incorpora - en el interior hidrofóbico de la membrana plasmática e induce cambios conformacionales en los sistemas de transporte (sustratos, iones, etc), concomitantemente con la separación de los microfilamentos insertados en la superficie interna de la membrana plasmática (43,44). Esta interac-ción, además de interferir con la función de los filamentos de actina, causa una rápida y severa inhibición en el transporte de hexosas, principalmente de glucosa, lo cual - explica la inhibición de ciertas actividades metabólicas - en las células y la pérdida de las propiedades contrácti-les de estas entidades (60,61).

## b.2.- COLCHICINA

Nombre sistemático	7-acetamino-1,2,3,10-tetrametoxi-6,7-dihidrobenceno- $[\alpha]$ heptalen-9 (5H)-ona.
Fórmula condensada	$C_{22}H_{25}NO_6$
Peso molecular	399.43
Rotación óptica	$[\alpha]_D^{17} - 429^\circ$
Solubilidad	etanol, cloroformo.
Estructura	



La Colchicina es un alcaloide obtenido de la planta "Colchicum autumnale" así como de otras plantas de la familia colchicum y grupos relacionados (54,62).

## MECANISMOS DE ACCION PROPUESTOS

La Colchicina es un derivado de tropolona con tres anillos: un anillo aromático (A) con tres grupos metoxi, un anillo de siete átomos de carbono (B) con un grupo amino como sustituyente en C16, y un anillo de tropolona (C) con un oxígeno y un grupo metoxi en las posiciones 1 y 2 - respectivamente. Se ha señalado que las siguientes estructuras son necesarias para que la molécula presente actividad: el grupo metoxi en el anillo A; que el anillo C esté íntegro y que presente el grupo metoxi en la posición 2 - del anillo C (63).

El mecanismo de acción propuesto para Colchicina - señala que este compuesto se une firme y específicamente a la proteína que forma los microtúbulos (tubulina), inhibiendo el ensamble de las subunidades de tubulina para formar estas estructuras (62,64). Este efecto puede observarse utilizando concentraciones muy bajas de Colchicina - ( $< 10^{-6}$  M) en ciertos tipos de microtúbulos, especialmente los del huso acromático.

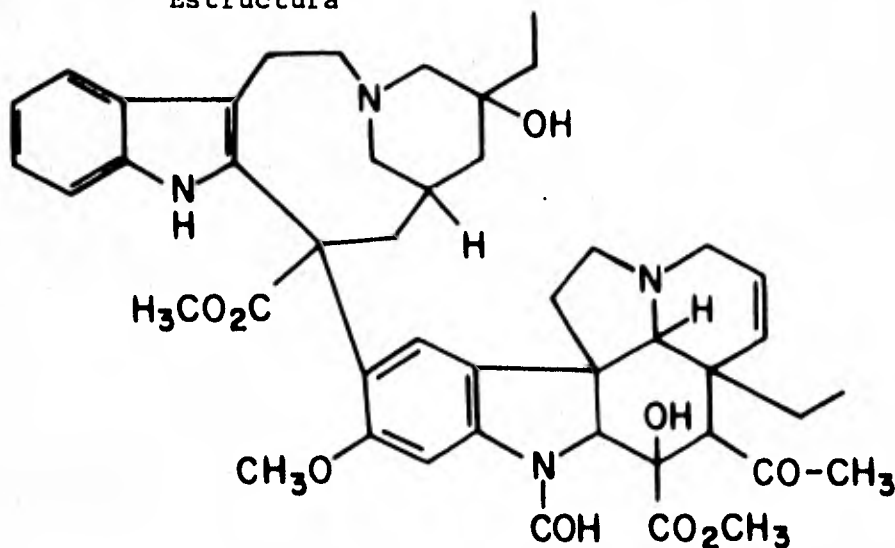
Durante muchos años se ha señalado que la Colchicina no se une a los microtúbulos intactos, posiblemente por un impedimento estérico (65), y que este efecto puede deberse a dos mecanismos diferentes:

1. La Colchicina se une a las subunidades de tubulina impidiendo su ensamble y, por lo tanto, la formación de los microtúbulos denominados lábiles (46).

2. La Colchicina se une a tubulina soluble rompiendo el equilibrio existente entre los microtúbulos formados y las subunidades de tubulina, lo que ocasiona que los microtúbulos se desensamblen para restaurar el equilibrio (65).

## b.3.- VINCRISTINA.

Nombre sistemático	(/3aR-3a,4,5a,9 (3R,5S,7R,9S),10bR,13a)-7-metil-4-(acetoxi)-3a-etil-9-5-etil-1,4,5,6,7,8,9,10-octahidro-5-hidroxi-9-(metoxicarbonil)-2H-3,7-metano-azacicoundecino [5,4b] indol-9-il-3a,4,5,5a,6,11,12,13a-octahidro-5-hidroxi-8-metoxi-6-metil-1H-indolizino [8,1-cd] carbazol-5-carboxilato.
Fórmula condensada	C <sub>46</sub> H <sub>56</sub> N <sub>4</sub> O <sub>10</sub>
Peso molecular	824.9
Rotación óptica	[α] <sub>D</sub> <sup>25</sup> + 17°
Solubilidad	metanol
Estructura	



La Vincristina es un principio activo extraído de la planta "Catharanthus roseus" (66).

## MECANISMOS DE ACCION PROPUESTOS.

La Vincristina es un derivado indólico bifuncional formado por una molécula de Vindolina, la cual es inactiva, y otra de Catarantina, en donde reside la actividad biológica de los alcaloides Vinca (62,67).

La interacción de los alcaloides Vinca con tubulina, provoca la disolución de los microtúbulos y la formación de cristales regulares de tubulina. Estos cristales contienen una mol de Vincristina unida por una mol de tubulina (62).

Se ha encontrado que la adición de Vincristina a sistemas de incubación *in vitro*, causa la precipitación de tubulina (68); también se ha demostrado que este alcaloide provoca la formación de cristales *in vivo* (62). Estos efectos son dependientes de la concentración y para obtener una precipitación completa, se requieren concentraciones elevadas de Vincristina ( $>1$  mM) (69).

La precipitación *in vitro* y la formación de cristales *in vivo*, parecen producirse por mecanismos diferentes, ya que se ha establecido la existencia de 2 sitios de unión entre Vincristina y tubulina, los cuales presentan propiedades fisicoquímicas y funcionales diferentes: el primero tiene una constante de afinidad alta ( $6 \times 10^6$  M) y facilita el desensamble de los microtúbulos mediante la formación de paracristales ácidos; y el segundo sitio tiene una constante de afinidad baja ( $8 \times 10^4$  M) e induce

la precipitación de tubulina *in vitro* (70). Por otra parte, la interacción de Vincristina con tubulina es rápida, reversible e independiente de temperatura en un rango entre 0 y 37°C, induciendo inhibición en el ensamble de los microtúbulos (62).



## 2. METODOLOGIA.

Se obtuvieron los complejos testículo-epidídimo de cobayos adultos, fértiles, sacrificados por dislocación cervical. Una vez disecado el complejo testículo-epidídimo, se procedió a ligar tanto el conducto deferente como la porción distal de la cauda del epidídimo correspondiente, que se colocó en una caja petri con solución salina isotónica, con pH de 7.6, a 37°C, con la finalidad de conservarla en condiciones adecuadas y mantener viables a los espermatozoides.

La cauda del epidídimo se colocó en un tubo de vidrio siliconizado con 5 ml. de NaCl 0.154 M, instilándose 2 ml. de esta solución a través del conducto deferente y seccionando la porción distal de la cauda, obteniéndose así los espermatozoides. La suspensión celular se hizo pasar a través de una pipeta pasteur en la cual se empacaron laxamente 10 mg de fibra de vidrio, con el objeto de separar las células viables de las no viables y así obtener una población más homogénea de células, con una mayor eficiencia en la reacción acrosomal *in vitro* (71).

Con el objeto de concentrar y lavar los espermatozoides de los componentes y/o secreciones del epidídimo, se centrifugó a 750 rpm, durante 7 min, a 32-35°C, resuspendiendo las células v/v con solución de NaCl 0.154 M, las cuales se contaron en una cámara de Neubauer para ajustar por dilución a una concentración de  $10^8$  células/ml

Con la finalidad de seleccionar las concentraciones óptimas en las cuales los inhibidores interfieren con la reacción acrosomal, sin modificar el patrón de movilidad, se probaron diferentes concentraciones ( 1  $\mu$ M - 1 mM) de los inhibidores para microfilamentos y microtúbulos antes mencionados, encontrándose que las concentraciones de 10, 25 y 50  $\mu$ M cumplen los requerimientos para este estudio.

Se preincubaron alícuotas de 500  $\mu$ l de la suspensión de células con las diferentes concentraciones de cada inhibidor, así como su control respectivo, durante 10 min, a 37°C. Después de esta preincubación los espermatozoides se lavaron, concentraron y posteriormente se resuspendieron con 1 ml de MCM, que contiene los sustratos necesarios para que estas células realicen el proceso de la capacitación-reacción acrosomal (43) (Fig.2). La incubación se llevó a cabo durante 4 h. a 37°C, bajo una atmósfera de 5 % CO<sub>2</sub> + aire.

Se tomaron alícuotas de estos sistemas de incubación cada hora, durante el período de cuatro horas y mediante un microscopio de contraste de fases se determinó el tanto por ciento de la reacción acrosomal.

Simultáneamente a esta evaluación se tomaron alícuotas para determinar la movilidad espermática, utilizando un método espectrofotométrico, el cual está basado en las características de anisotropía óptica que presentan las partículas elongadas en un flujo (72). En estas condiciones, tanto las partículas elongadas como los espermatozoides presentan una reotaxis positiva. Al detener el

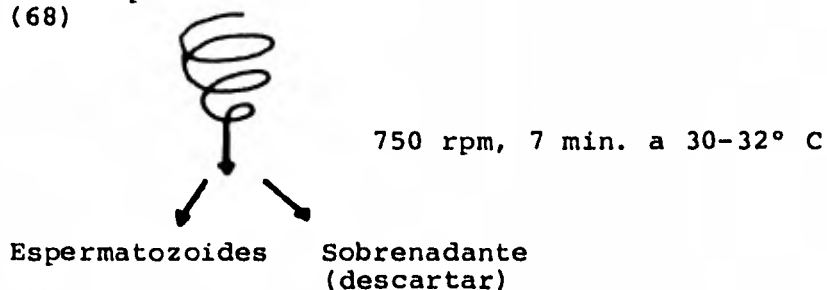
flujo se inicia el período de relajación correspondiente, - mismo que se traduce en un cambio en la densidad óptica. - Este cambio en la absorbancia está relacionado con la distribución al azar de los espermatozoides al detener el flujo y es directamente proporcional a la movilidad de estas células (72).

El índice de movilidad espermática (IME) en los espermatozoides de cobayo se determinó de la siguiente forma: alícuotas de  $50 \times 10^6$  espermatozoides, diluidos en un volumen final de 9 ml de MCM, se hicieron pasar a través de una celdilla de flujo (Fig.3) a una velocidad constante de 7 ml/min, obteniéndose así una densidad óptica inicial ( $DO_i$ ) correspondiente a la turbidez de la suspensión celular. Los límites óptimos de turbidez se encontraron entre 0.7 - 0.9 unidades de absorbancia a 475 nm, lo que permitió establecer, bajo estas condiciones, la basal correspondiente. Ahora bien, al detener el flujo se observó un cambio en la densidad óptica, debido a la distribución al azar de estas células. Las pendientes resultantes en función de tiempo, 30 seg ( $DO_f$ ) nos permitieron establecer el IME (Fig.4), parámetro que nos permitió evaluar cuantitativa y comparativamente la fase experimental y el control respectivo durante este estudio, bajo las condiciones antes mencionadas.

FIGURA 2

OBTENCION DE ESPERMATOZOIDES DE CAUDA DE EPIDIDIMO

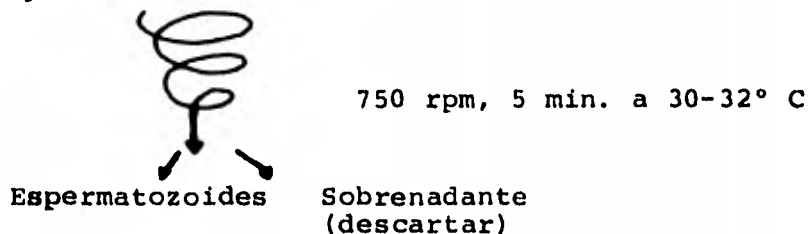
- Perfusión con NaCl 0.154 M, pH = 7.4
- Filtrar la suspensión celular en columna de fibra de vidrio (68)



- Resuspender en NaCl 0.154 M, pH 7.4
- Contar y ajustar a  $10^8$  células/ml.

INCUBACION

- 1) 10 min en NaCl 0.154 M, pH 7.4 a 37°C.
  - a) Control ( 2 X )
  - b) Experimento ( 2 X )



- 2) 4 horas en MCM (52), pH 7.6 - 7.8 a 37° C.

Atmósfera: 5 % CO<sub>2</sub> + aire.

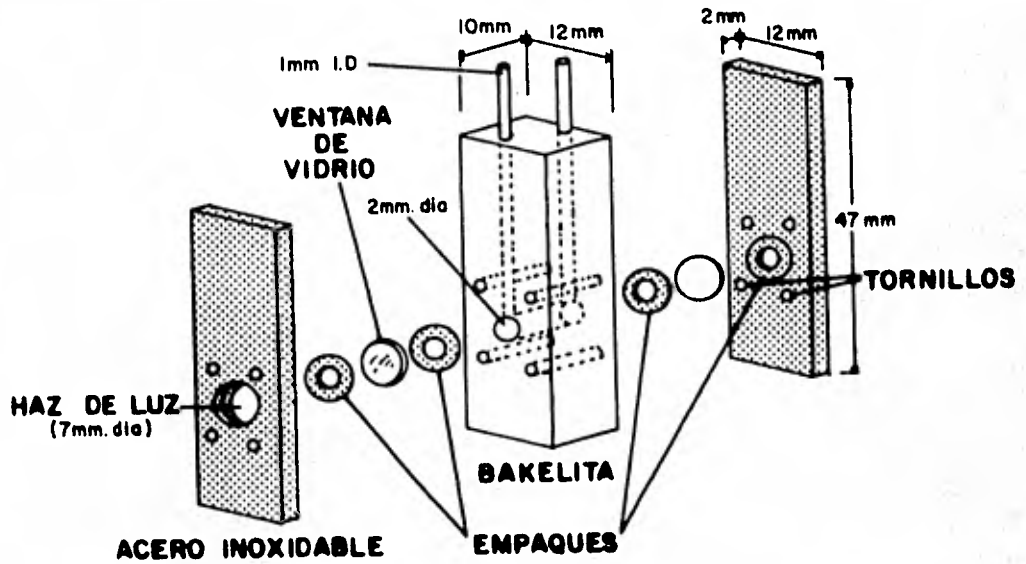


Fig. 3 ESQUEMA DESCRIPTIVO DE LA CELDILLA DE ATHERTON (42)

## EVALUACION DE LA MOVILIDAD DEL ESPERMATOZOIDE POR ESPECTROFOTOMETRIA

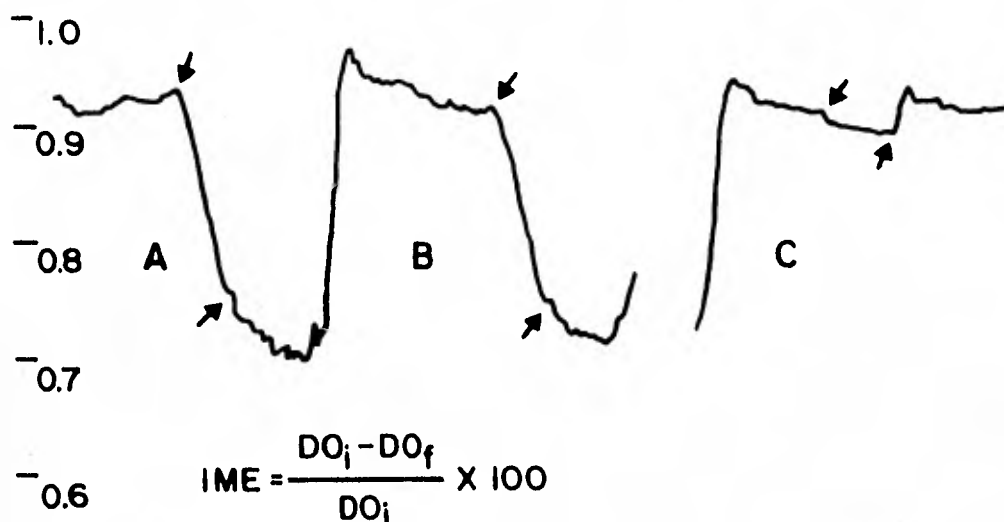


Fig. 4. DETERMINACION ESPECTROFOTOMETRICA DE LA MOVILIDAD ESPERMATICA

Se muestran los registros obtenidos por espectrofotometría correspondientes a suspensiones de espermatozoides en donde se observa: (A) y (B) espermatozoides móviles; (C) espermatozoides inmóviles. Las flechas superiores indican la densidad óptica inicial ( $\text{DO}_i$ ) que se registra inmediatamente antes de detener el flujo. Las flechas inferiores muestran el cambio en la densidad óptica final ( $\text{DO}_f$ ) registrada 30 seg después de detener el flujo. La fórmula expresada permite obtener el índice de movilidad espermática (IME).

III. RESULTADOS OBTENIDOS.

## RESULTADOS

Espermatozoides de cobayo fueron incubados con cada uno de los inhibidores específicos para proteínas parecidas a actina (Citocalasina B) y tubulina (Colchicina y Vincristina) a diferentes concentraciones (10, 25, 50  $\mu\text{M}$ ).

Los resultados de este estudio implican 5 experimentos para cada inhibidor con el control respectivo.

Para evaluar la presencia de proteínas parecidas a actina, se agregó al sistema de incubación Citocalasina B a las concentraciones señaladas, con las cuales se obtuvo una marcada inhibición de la reacción acrosomal (Tabla II). Como puede observarse, a la concentración de 50  $\mu\text{M}$  se obtuvo un 51% de reacción acrosomal al término del periodo de incubación (4 h.), comparado con 77% obtenido en el control (Fig.5).

El efecto del alcaloide de *Colchicum autumnale* (Colchicina), en nuestro modelo experimental a las concentraciones señaladas, tradujo una inhibición significativa de la reacción acrosomal con todas las concentraciones usadas (Tabla III). La concentración de 50  $\mu\text{M}$  de Colchicina indujo un 65 % de inhibición de la reacción acrosomal al final del periodo de incubación, cuando se comparó con el respectivo control (Fig.6).

Por otra parte el efecto de los alcaloides Vinca (Vincristina) en el ensamble y desensamble de proteínas



contráctiles (tubulina) involucradas en la dinámica de la reacción acrosomal, dieron como resultado un 42 % de inhibición en este proceso al utilizar 50  $\mu$ M de Vincristina, - comparado con 77 % de reacción acrosomal en el control, al término del período de incubación (Tabla IV, Fig.7).

Para garantizar la no interferencia con la movili - dad espermática de los inhibidores Citocalasina B, Colchi - cina y Vincristina a las concentraciones antes menciona - das, se procedió a determinar el índice de movilidad es - permática (IME) simultáneamente con la evaluación de la - reacción acrosomal, utilizando el método espectrofotomé - trico descrito en la sección correspondiente.

Los valores obtenidos del IME con espermatozoides - de cobayo, representan la media  $\pm$  1 desviación estándar - de 5 experimentos (Fig.8).

Los resultados obtenidos demuestran que la adición de Citocalasina B al medio de incubación, no interfiere - significativamente con la movilidad del espermatozoide de cobayo en las primeras 3 horas de incubación; en tanto que al final del período de incubación (4 h) se encuentra una ligera disminución en el parámetro ( -8.6%) (N.S.).

Cuando se utilizó Colchicina, se obtuvieron valo - res similares al control durante las tres primeras horas - de incubación, no siendo así durante la cuarta, en donde - se observó un ligero incremento en la movilidad espermática (30%) ( $P < 0.10$ ). Por otra parte, los resultados obtenidos en presencia de Vincristina mostraron un aumento -

significativo (  $P < 0.005$  ) en la movilidad del esperma -  
tozoide de cobayo durante todo el período de incubación.

## CITOCALASINA B

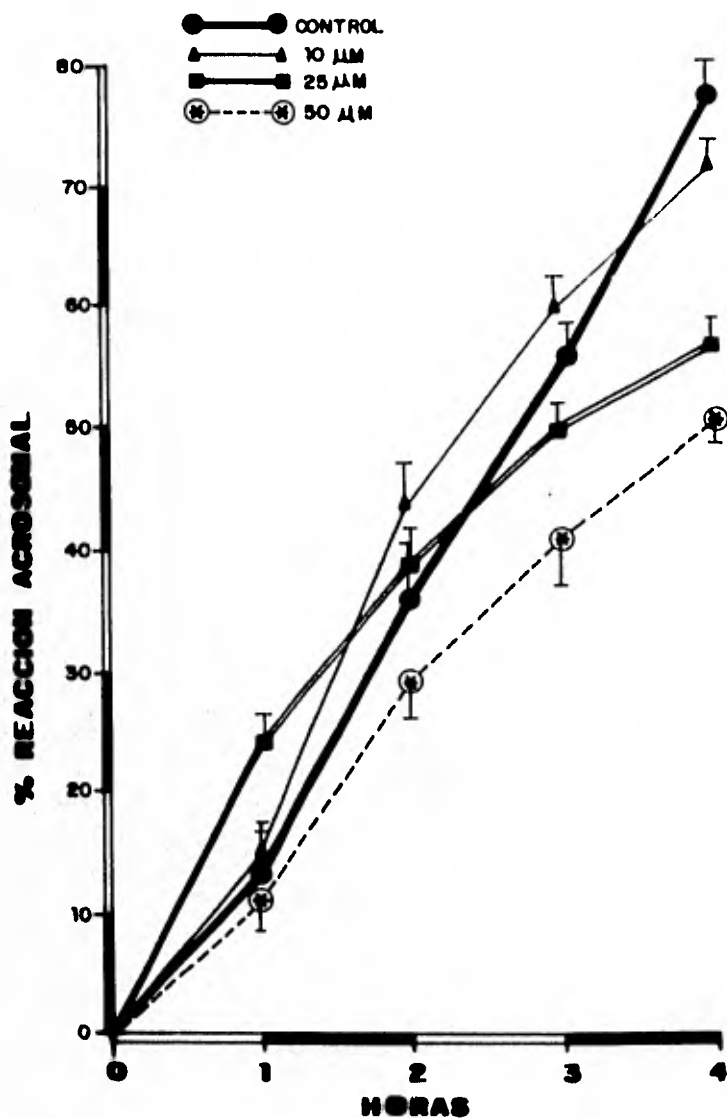


FIG. 5 INTERACCION DE CITOCALASINA B CON PROTEINAS PARECIDAS A ACTINA DURANTE EL PROCESO DE LA REACCION ACROSOMAL.

Cada punto representa el promedio de cinco experimentos + desviación estándar. Obsérvese que el efecto inhibitorio de citocalasina B sobre la reacción acrosomal es independiente de la concentración. La concentración más eficiente es de 50  $\mu$ M para inducir una disminución significativa al final del período de incubación (4 h).

TABLA II

## CITOCALASINA B

Concentración de inhibidor	Tiempo	Por ciento de Inhibición de Reacción Acrosomal en relación al control.
10 $\mu$ M	1 hora	0
	2 horas	0
	3 horas	0
	4 horas	6 %
25 $\mu$ M	1 hora	0
	2 horas	0
	3 horas	11 % *
	4 horas	26 % **
50 $\mu$ M	1 hora	0
	2 horas	19 % *
	3 horas	26 % **
	4 horas	34 % ***

$$\% \text{ Inhibición de R.A.} = 100 - \left( \frac{\% \text{ R.A. exp.}}{\% \text{ R.A. control}} \times 100 \right)$$

\* P ( &lt; 0.05)

\*\* P ( &lt; 0.005)

\*\*\* P ( &lt; 0.0005)

## COLCHICINA

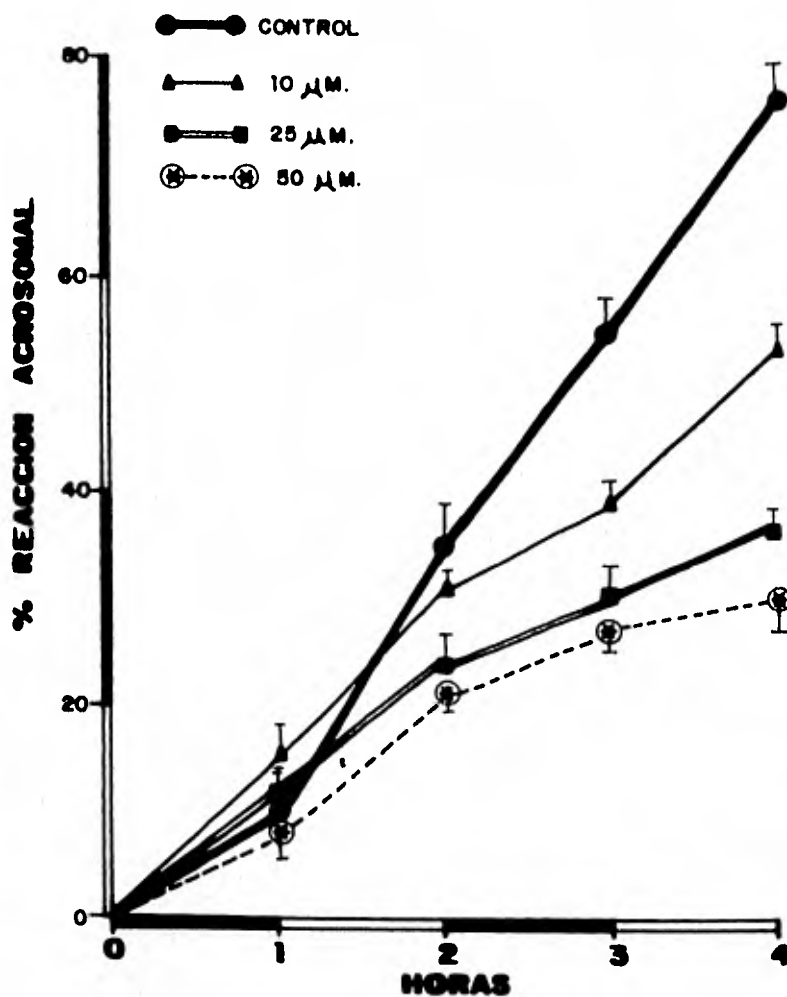


FIG. 6. INTERACCION ESPECIFICA DE COLCHICINA CON TUBILINA DURANTE LA REACCION ACROSOMAL.

Cada punto en la gráfica representa la media + desviación estándar de cinco experimentos. Se observó disminución significativa, - dependiente de concentración, en la reacción acrosomal.

TABLA III

## COLCHICINA

Concentración de inhibidor	Tiempo	Por ciento de Inhibición en Reacción Acroso - mal en relación al Control.
10 $\mu$ M	1 hora	0
	2 horas	11 %
	3 horas	30 % *
	4 horas	42 % **
25 $\mu$ M	1 hora	0
	2 horas	39 % **
	3 horas	46 % **
	4 horas	52 % ***
50 $\mu$ M	1 hora	12 %
	2 horas	42 % **
	3 horas	54 % ***
	4 horas	65 % ***

$$\% \text{ Inhibición de R.A.} = 100 - \left( \frac{\% \text{ R.A. exp.}}{\% \text{ R.A. control}} \times 100 \right)$$

\* P ( &lt; 0.05)

\*\* P ( &lt; 0.005)

\*\*\* P ( &lt; 0.0005)

## VINCRISTINA

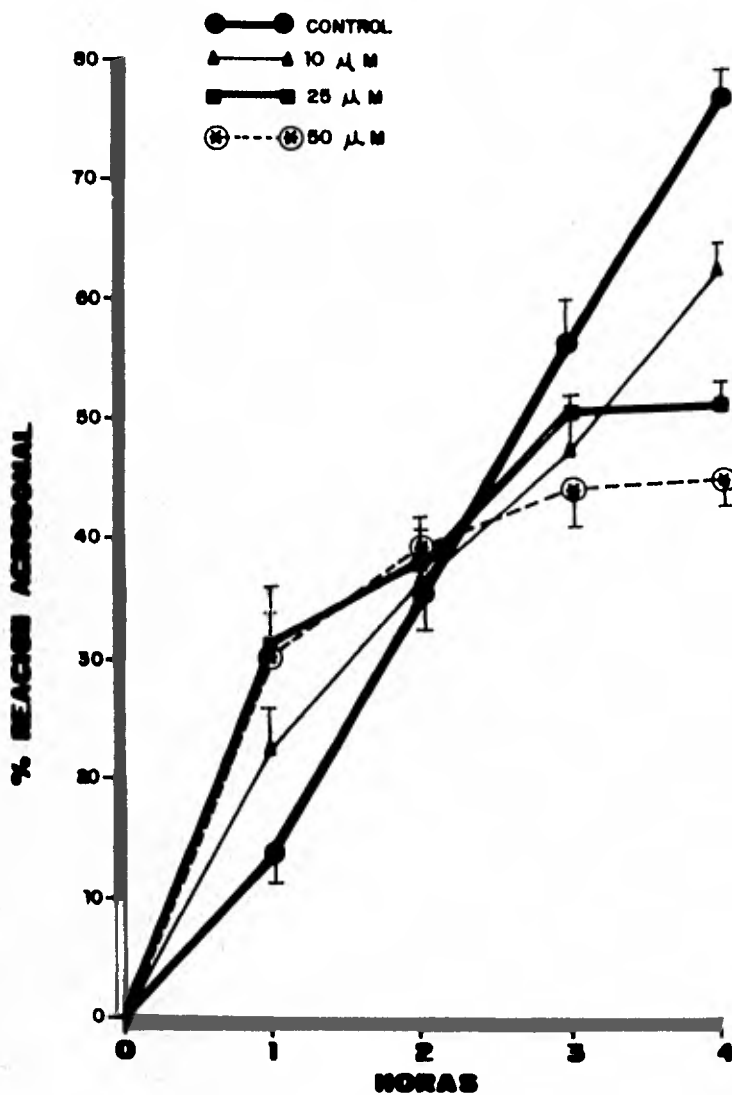


FIG. 7 INTERFERENCIA CON EL ENSAMBLE-DESENSAMBLE DE LOS MICROTUBULOS CON VINCRISTINA EN LA DINAMICA DE LA REACI3N ACROSOMAL.

Cada punto en la gr3fica representa la media + desviaci3n est3ndar de cinco experimentos. Se observ3 un marcado efecto inhibitorio a la mayor concentraci3n de este alcaloide Vinca, (50  $\mu$ M) en la 3ltima hora de incubaci3n.

TABLA IV

## VINCRISTINA

Concentración de inhibidor	Tiempo	Por ciento de Inhibición de Reacción Acrosomal en relación al control.
10 $\mu$ M	1 hora	0
	2 horas	3 %
	3 horas	16 % *
	4 horas	19 % *
25 $\mu$ M	1 hora	0
	2 horas	0
	3 horas	18 % *
	4 horas	34 % **
50 $\mu$ M	1 hora	0
	2 horas	0
	3 horas	22 % **
	4 horas	42 % ***

$$\% \text{ Inhibición de R.A.} = 100 - \left( \frac{\% \text{ R.A. exp.}}{\% \text{ R.A. control}} \times 100 \right)$$

\* P ( &lt; 0.05)

\*\* P ( &lt; 0.005 )

\*\*\* P ( &lt; 0.0005)



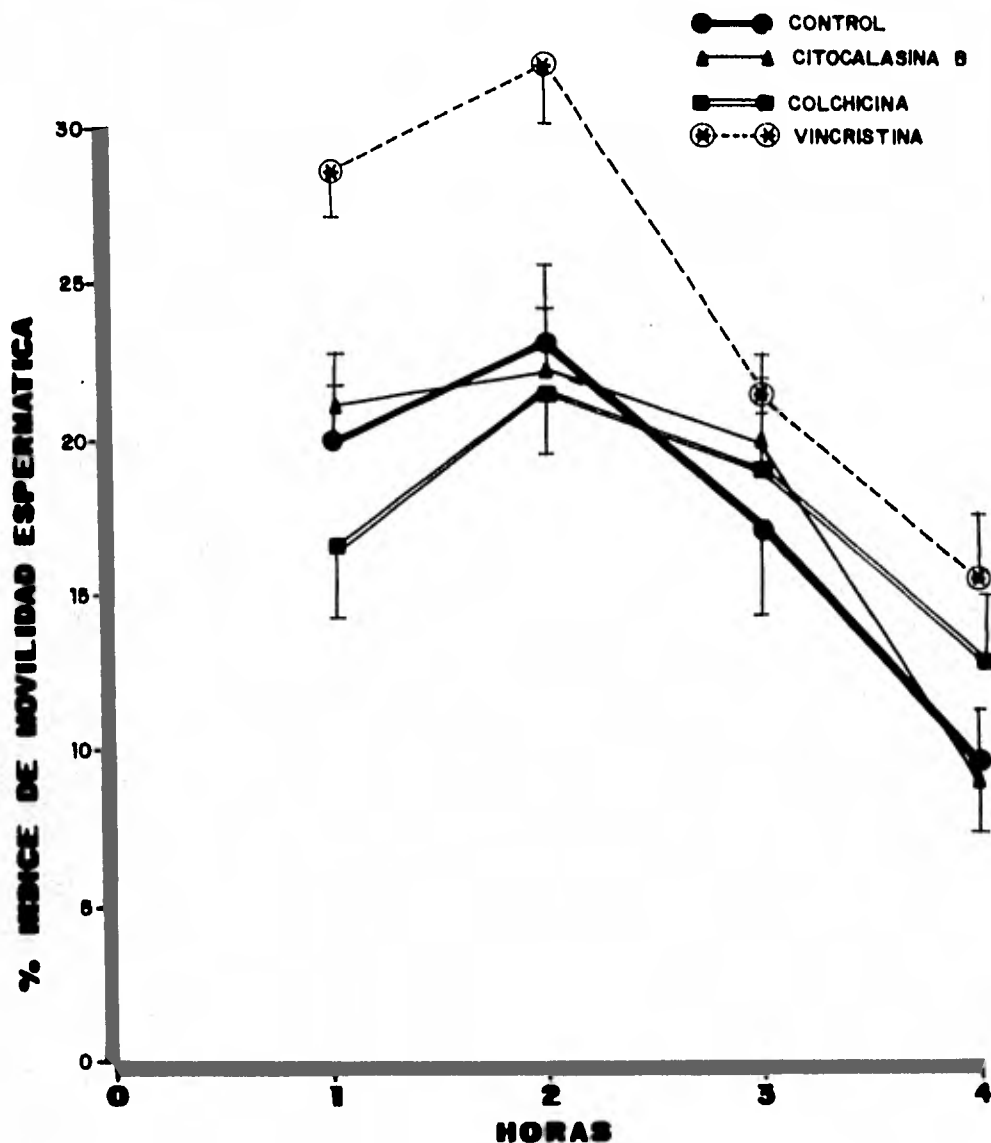


Fig. 8 INDICE DE MOVILIDAD ESPERMATICA (IME) DEL ESPERMATOZOIDE DE COBAYO.

El índice se determinó por el método espectrofotométrico descrito por Atherton (72). Cada punto corresponde a la media  $\pm$  desviación estándar de cinco experimentos.

#### IV. DISCUSSION.

## DISCUSION.

En los eventos moleculares involucrados en la reacción acrosomal del espermatozoide de mamífero, participan integralmente tanto componentes bioquímicos de la matriz acrosomal y de las membranas correspondientes a estas entidades, como constituyentes del microambiente periovlatorio de la trompa de Falopio (16) (Tabla V).

Se ha demostrado que los componentes de la matriz acrosomal que participan en este proceso son: la conversión de proacrosina en acrosina, que activa a la fosfolipasa B; la actividad de las ATPasas, tanto la dependiente de calcio, como la dependiente de sodio y potasio; así como la liberación simultánea de zinc (16). A estos eventos unimos nuestra HIPOTESIS de trabajo, que tiene como objetivo determinar la presencia y participación de proteínas parecidas a actina y tubulina en la dinámica de la secreción y/o liberación de las actividades hidrolíticas ácidas contenidas en la matriz acrosomal; estas actividades son estrictamente necesarias para el paso del espermatozoide a través de las investimentas del ovocito para poder fertilizarlo.

Debido a que los gránulos secretores, lisosomas y acrosoma, son estructuras subcelulares que tienen un mismo origen de diferenciación (aparato de Golgi) (29), no es sorprendente que todos ellos tengan una extraordinaria similitud, no solo en sus características estructurales, sino también en su función fisiológica propiamente dicha.

Por lo tanto, el concepto tradicional de la relación proceso patológico-lisosoma, actualmente ha sido reemplazado por la participación de los gránulos secretores, lisosomas y acrosomas en expresiones importantes de la fisiología celular como : menstruación (73), secreción de insulina (74), fagocitosis (75) y la reacción acrosomal propiamente dicha (16,76).

Es particularmente interesante la interrelación lisosoma-endometrio y su participación en la menstruación en primates superiores, incluyendo humano, en donde el predominio estrogénico induce un aumento en el número y tamaño de los lisosomas, así como cambios en la permeabilidad de sus membranas, que facilitan la liberación de las actividades hidrolíticas ácidas (73). Por otra parte, estudios recientes han establecido que los microfilamentos y los microtúbulos juegan un papel importante en la actividad secretora de los islotes de Langerhans (74), debido a que la adición de inhibidores específicos de estas estructuras (Citocalasina B, Colchicina y Vincristina), a sistemas de incubación *in vitro*, indica una interferencia significativa con la secreción de insulina (74,77); inclusive se ha propuesto que el mecanismo de este proceso comprende dos etapas; una rápida, en la cual se liberan los gránulos secretores de las proximidades de la membrana plasmática mediante una red transmembranal constituida por moléculas parecidas a actina; y una segunda etapa, lenta, que requiere la participación simultánea de microfilamentos y microtúbulos (74).

Esta expresión de funcionalidad en las diferentes estirpes celulares mencionadas, tiene un denominador

común: la organización de estructuras dinámicas como son - microfilamentos y microtúbulos, cuya integración y función está modulada por calcio y nucleótidos cíclicos (AMPc y - GMPc), como consecuencia de un estímulo hormonal o una necesidad de la función celular.

Por lo tanto los resultados obtenidos en este trabajo son importantes, debido a la interferencia significativa obtenida al final del período de incubación de 4 h. - cuando se adicionó Citocalasina B, Colchicina y Vincristina (34%, 65% y 42% respectivamente), a un sistema de incubación no sincrónico para inducir *in vitro* reacción acrosomal en espermatozoides de cobayo.

Estos resultados son un apoyo sólido para proponer la presencia y participación de estructuras parecidas a - actina y componentes proteínicos solubles, de 120 000 - daltons, tubulina, en la dinámica de la liberación y/o secreción de las actividades hidrolíticas ácidas de esta entidad.

La observación de que los inhibidores empleados, a las concentraciones utilizadas en este estudio, no interfieren significativamente con la movilidad de los espermatozoides, indica que existe una regionalización de las características membranales de esta célula, ya que por ejemplo, la permeabilidad a estos compuestos resulta diferente en la región acrosomal y en la pieza media y flagelo del - espermatozoide. Esto también podría implicar la existencia de dos tipos de microtúbulos en esta célula: estables y lábiles. Los microtúbulos del flagelo y pieza media -

corresponderían a la categoría de estables y por lo tanto no son afectados por los inhibidores en estas condiciones experimentales; los presentes en el acrosoma serían microtúbulos lábiles, sensibles a las concentraciones de inhibidores utilizadas, las cuales se ensamblan dependiendo de las necesidades fisiológicas de la célula.

Estos datos, conjuntamente con la existencia de una relación diferencial precisa de AMPc/GMPc periovulatorio, tanto en el microambiente endometrial como en el lumen de la trompa de Fallopio (3,76), concatenado con la presencia de sitios receptores para AMPc en las membranas acrosomales del espermatozoide humano (78), que en condiciones que incluyen la presencia de primeros mensajeros (  $17\beta$ -estradiol, progesterona, catecolaminas, prolactina) (79,80,81,82) y calcio (83), determina la fosforilación de componentes membranales (84) que traducen cambios membranales en estas estructuras, son aspectos moleculares que se agregan al conocimiento de los mecanismos bioquímicos que inician y regulan la reacción acrosomal en el espermatozoide de mamífero.

TABLA V

FACTORES QUE INFLUYEN EN LA REACCION ACROSOMAL

ESPERMATOZOIDE:

- Fosfolipasa (s)
- ATPasa , ATP
- Adenilato Ciclasa
- Guanilato Ciclasa
- Acrosina
- Microtúbulos y/o Actina
- $H^+$ ,  $Ca^{++}$  y  $Zn^{++}$  acrosomales

MICROAMBIENTE:

- $Ca^{++}$ ,  $Zn^{++}$
- Albúmina { Acidos Grasos  
Catecolaminas  
Esteroides
- AMFc y GMFc
- Ionóforos Biológicos

V. CONCLUSIONES.



## CONCLUSIONES

Se determinó indirectamente la presencia de tubulina y proteínas parecidas a la actina en la región acrosomal del espermatozoide de mamífero, a través de la utilización de inhibidores específicos para estas proteínas.

Se estableció la participación dinámica de microfilamentos y microtúbulos en la reacción acrosomal, ya que se observó una inhibición significativa en este proceso al utilizar los diferentes inhibidores, lo que implica la existencia de microtúbulos lábiles en el acrosoma del espermatozoide de mamífero, los cuales se ensamblan dependiendo del estado fisiológico celular.

La interferencia obtenida de los inhibidores utilizados en nuestro estudio fue selectiva para los microfilamentos y microtúbulos de la región acrosomal, ya que no interfirió significativamente con la movilidad de los espermatozoides, lo cual también indica que existe una regionalización de las características membranales de los espermatozoides de mamífero.

**VI. RESUMEN**

## RESUMEN

El acrosoma del espermatozoide de mamífero parece tener características estructurales y funcionales de un gránulo secretor; sus enzimas hidrolíticas ácidas participan en la fertilización del ovocido homólogo. El objetivo de este estudio es señalar la participación de microtúbulos y microfilamentos en la reacción acrosomal. Los espermatozoides se obtienen de cauda de epidídimo de cobayos machos, adultos y fértiles. Se preincubaban alícuotas de  $5 \times 10^6$  espermatozoides, metabólicamente activos, en presencia de Citocalasina B, Colchicina y Vincristina, a concentraciones de 10, 25 y 50  $\mu\text{M}$  para cada uno de ellos. Posteriormente los espermatozoides se resuspenden en un Medio Capacitante Mínimo, a pH 7.6, en el cual se incuban 4 h. a 37°C. Cada hora del período de incubación evalúa comparativamente, tanto en la fase experimental como en el control respectivo, reacción acrosomal y movilidad espermática, mediante microscopía de contraste de fases y espectrofotometría (475 nm) respectivamente. Al final del período de incubación nuestros resultados indican una inhibición significativa de la reacción acrosomal, dependiente de la concentración (Citocalasina B 34%, Colchicina 65%, Vincristina 42%), lo que permite proponer que en la dinámica de la reacción acrosomal del espermatozoide de mamífero participan proteínas parecidas a actina y tubulina, a semejanza funcional de un gránulo secretor.

VII. BIBLIOGRAFIA.

## BIBLIOGRAFIA.

1. Chang Mc, Austin Cr, Bedford JM, Brackett BG, Hunter RHF, Yanagimachi R. (1977). Capacitation of spermatozoa and fertilization in mammals. En: Frontiers in Reproduction and Fertility Control. Greep RW, Koblinsky ME. (Eds). M.I.T. Press, Cambridge, p. 434.
2. Bedford JM.(1970) Sperm capacitation and fertilization in mammals. Biol. Reprod. 2 (suppl): 128.
3. Reyes A, Chavarría ME, Rosado A. (1980) Interference with spermatozoa capacitation. En: Clinics in Andrology, Vol 5: Regulation of Male Fertility. Cunningham GR, Schill WB, Hafez ESE (eds) Martinus Nijhoff Pub. B.V. Amsterdam, p. 135.
4. Yanagimachi R. Usui N.(1974) Calcium dependence of acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. Exp Cell Res. 89: 161.
5. Rosado A, Hicks JJ, Reyes A, Blanco I. (1974) Capacitation *in vitro* of rabbit spermatozoa with cyclic adenosine monophosphate and human follicular fluid. Fertil Steril. 25: 821.
6. Hicks JJ, Martínez-Manautou J, Pedrón N, Rosado A. (1972) Metabolic changes in human spermatozoa related to capacitation. Fertil Steril. 23: 172.
7. Hicks JJ, Pedrón N, Rosado A.(1972) Modifications of human spermatozoa glycolysis by cyclic adenosine monophosphate (cAMP), estrogens and follicular fluid. Fertil Steril. 23: 886.
8. Mercado E. Hicks JJ, Drago C, Rosado A. (1974) A study of the interaction of human spermatozoa membrane with ATP and cyclic-AMP. Biochem Biophys Res Commun. 56: 185.

9. Mercado E, Rosado A. (1973) Structural properties of the membrane of intact human spermatozoa. A study with fluorescent probes. *Biochem Biophys Acta*. 298: 639.
10. Friend DS, Orci L, Perrlet A, Yanagimachi R. (1977) Membrane particle changes attending the acrosome reaction in guinea pig spermatozoa. *J. Cell Biol.* 74: 561.
11. Hernández Jáuregui P, Sosa A, González-Angulo A, Rosado A. (1975) The glycocalyx in human spermatozoa: a cytochemical study. En : *Electron microscopic concepts of secretion. Ultrastructure of Endocrinal and Reproductive organs.* Hess M. (ed) John Wiley and Sons. New York. p. 223.
12. Velázquez A, Rosado A. (1972) Cell polarography I. Study of the surface characteristics of human spermatozoa. *Fertil Steril.* 23: 562.
13. Rosado A, Velázquez A, Lara Ricalde R. (1973) Cell polarography. II. Effect of neurominidase and follicular fluid upon the surface characteristics of human spermatozoa. *Fertil Steril.* 24: 349.
14. Delgado N, Huacuja L, Pancardo RM, Merchant H, Rosado A. (1976) Changes in the protein conformation of human spermatozoal membranes after treatment with cyclic adenosine 3'-5'-monophosphate and human follicular fluid. *Fertil Steril.* 27: 413.
15. Kinsey WH, Koehler JK. (1978) Cell surface changes associated with *in vitro* capacitation of hamster sperm. *J Ultrastruct Res.* 64: 1.
16. Meizel S. (1978) The mammalian sperm acrosome reaction a biochemical approach. En: *Development in Mammals. Vol. 3* Johnson MH (Ed) North Holland Pub. Co. Amsterdam. p. 339.

17. Austin CR. (1960) Capacitation and the release of - hyaluronidase for spermatozoa. J Reprod Fertil 1: - 310.
18. Gould SF, Bernstein MH. (1973) Localization of bull sperm hyaluronidase. J Cell Biol. 59: 119.
19. Stambaugh R, Buckley J. (1969) Identification and - subcellular localization of the enzymes effecting - penetration of the zona pellucida by rabbit spermatozoa. J Reprd Fertil. 19: 423.
20. Schill WB, Fritz H. (1975) N- $\alpha$  - Benzoyl-L-arginine ethyl ester splitting activity (acrosin) in human - spermatozoa and seminal plasma during aging *in vitro*. Hoppe-Seyler's Z. Physiol Chem 356: 83.
21. Stambaugh R, Buchley J. (1972) Studies on acrosomal - proteinase of rabbit spermatozoa. Biochem Biophys Acts. 284: 473.
22. Zanaveld LJD, Dragoje BM, Schumacher GFB. (1972) - Acrosomal proteinase and proteinase inhibitor of human spermatozoa. Science 177: 702.
23. Morton DB. (1975) Acrosomal enzymes: immunochemical - localization of acrosin and hyaluronidase in ram - spermatozoa. J Reprod Fertil. 45: 375.
24. Garner DL, Easton MP. (1977) Immunofluorescent locali- zation of acrosin in mammalian spermatozoa. J Exp Zool. 200: 157.
25. Schleuning WD, Hell R, Fritz H. (1976) Multiple forms of human acrosin: isolation and properties. Hoppe-Seyler's Z. Physiol Chem. 357: 855.
26. Bryan JHD, Unnithan RR. (1973) Cytochemical localiza- tion of non-specific esterase and acid phosphatase in spermatozoa of the mouse (*Mus musculus*). Histochem - 33: 169.

27. Srivastava PN, Zaneveld LJD, Williams WL. (1970) -  
Mammalian sperm acrosomal neuraminidases. *Biochem* -  
*Biophys Res Commun.* 39: 575.
28. Hartree EF. (1977) Spermatozoa eggs and proteinase.  
The eleventh CIBA medal lecture. *Biochem Soc Trans*  
5: 375.
29. Allison AC, Hartree EF. (1970) Lysosomal enzymes in  
the acrosome and their possible role in fertilization  
*J Reprod Fertil.* 21: 501.
30. Couchie J, Mann T. (1957) Glycosidases in mammalian  
sperm and seminal plasma. *Nature* 179: 1190.
31. Meizel S, Colham J. (1972) Partial characterization -  
of a new bull sperm arylaminidase. *J Reprod Fertil.* -  
28: 303.
32. Koren E, Milkoric S. (1973) Collagenase-like -  
peptidase in human, rat and bull spermatozoa. *J* -  
*Reprod Fertil.* 32: 349.
33. Srivastava PN, Munnell JF, Yang CH, Foley CW. (1974) -  
Sequential release of acrosomal membranes and -  
acrosomal enzymes of ram spermatozoa. *J Reprod Fert.* -  
36: 363.
34. Stambaugh R, Smith M. (1976) Sperm proteinase -  
release during fertilization of rabbit ova. *J Exp* -  
*Zool.* 197 : 121.
35. Bedford JM. (1974) Mechanism involved penetration of  
spermatozoa through vestments of mammalian egg. En:  
*Physiology and Genetics of Reproduction, Parte B.*  
Coutinho EM, Fuchs F. (Eds) Plenum Press. New York  
p. 55.



36. Talbot P, Franklin LE. (1974) Hamster sperm -  
hialuronidase. II. Its release from sperm *in vitro* in  
relation to the degenerative and normal acrosome -  
reaction. J Exp Zool 189: 321.
37. Mercado E, Rosado A. (1975) Estudio cinético de la -  
actividad proteolítica del espermatozoide humano in -  
tacto. Arch Invest Med. 6: 65.
38. Stambaugh R, Smith M. (1978) Tubulin and microtubule-  
like structures in mammalian acrosomes. J Exp Zool.  
203: 135.
39. Hartree EF. (1970) The acrosome-lysosome relation -  
ship. J Reprod Fertil. 44: 125.
40. Dedaman JR, Brinkley BR, Means AR. (1979) Regulation  
of microfilaments and microtubules by calcium and -  
cyclic AMP. En: Advances in Cyclic Nucleotide -  
Research. Greengard P, Robison GA. (Eds) Vol. 11 -  
Raven Press, New York p. 131.
41. Weissmann G, Goldsberg I, Hoffstein S, Chauvet G, -  
Robineaux R. (1975) Ying-yang modulation of lysosomal  
enzyme release from polymorphonuclear leukocytes by  
cyclic nucleotides. Ann N.Y. Acad Sci. 256: 222.
42. Tilney LG, Mooseker M. (1971) Actin in the brush-  
border of epithelial cells of the chicken intestine.  
Proc Natl Acad Sci USA. 68: 2611
43. Spooner BS. (1978) Cytochalasins as probes in -  
selected morphogenetic processes. En: Cytochalasins,  
Biochemical and Cell Biological Aspects. Tanenbaum SW  
(Ed) Frontiers of Biology. Vol. 46. North Holland -  
Pub. Co. p. 65.
44. Pollard TD, Korn ED. (1973) The contractile proteins  
of *Acanthamoeba castellanii*. Cold Spring Harbor Symp.  
37: 573.

45. Hitchcock-De Gregori SE. (1980) Actin assembly. -  
Nature. 288: 437.
46. Bryan J. (1974) Biochemical properties of microtubules. Federation Proc. 33: 152.
47. Snyder JA, McIntosh JR. (1976) Biochemistry and -  
Physiology of microtubules. En: Annual Review of -  
Biochemistry Snell EE. (Ed) Vol. 45, Annual Reviews  
Inc. Palo Alto, California. p. 699.
48. Wilson L. (1973) Pharmacological and biochemical -  
properties of microtubule proteins. Symposium -  
Chairman. Federation Proc 33: 151.
49. Olmsted JB, Marcum JM, Johnson KA, Allen C, Borisy -  
GG. (1974) Microtubule assembly; some possible -  
regulatory mechanisms. J Supramol Struct. 2: 429.
50. Clarke GN, Yanagimachi R. (1978) Actin in mammalian  
sperm heads. J Exp Zool. 205 : 125.
51. Goldstein I, Hoffstein S, Gallin J, Weissmann G.  
(1973) Mechanisms of lysosomal enzyme release from --  
human leukocytes: microtubule assembly and membrane  
fusion induced by a component of complement. Proc  
Natl Acad Sci USA. 70: 2916.
52. Barros C. (1974) Capacitation of mammalian -  
spermatozoa. En: Physiology and Genetics of Reproduc-  
tion. Coutinho BEM, Fuchs F. (Eds) Plenum Press.  
New York, p.3
53. Tanenbaum J. (1978) Approaches to the molecular -  
biology of cytochalasin action. En: Cytochalasins,  
Biochemical and Cell Biological Aspects. Tanenbaum SW  
(Ed). Frontiers of Biology. Vol. 46, North Holland  
Pub. Co. p. 521

54. Fitzgerald TJ.(1976) Molecular features of colchicine associated with antimitotic activity and inhibition of tubulin polymerization. *Biochem Pharmacol.* 25: 1383. -
55. Himes RH, Kersey RN, Heller-Bettinger I, Samson FE. (1976) Action of the Vinca alkaloids vincristine, vinblastine and desacetyl vinblastine amine on microtubules *in vitro*. *Canc Res* 36: 3798. -
56. Tanenbaun SW.(1978) Microbiological, preparative and analytical aspects of cytochalasin production. En : *Cytochalasins, Biochemical and Cell Biological Aspects.* Tanenbaun SW (Ed) *Frontiers of Biology*, Vol 46, North Holland Pub. Co. p.2 -
57. Tamm CH. (1978) Chemistry and biosynthesis of cytochalasins. En: *Cytochalasins.* Tatum EL, Neuberger A. (Eds) Elsevier/North Holland Biomedical Press. p. 15 -
58. Aldridge DC, Armstrong JJ, Speakc RN, Turner WB. (1967) The cytochalasins, a new class of biologically active mould metabolites. *Chem Commun.* p. 26. -
59. Rampal AL, Pinkofsky HB, Jung CY. (1980) Structure of cytochalasin B binding sites in human erythrocyte membranes. *Biochem.* 19: 679. -
60. Estensen RD, Playemann PGW. (1972) Cytochalasin B. Inhibition of glucose and glucosamine transport. *Proc Natl Acad Sci USA.* 69: 1430. -
61. Mizel SB, Wilson L. (1972) Inhibition of hexose transport in mammalian cells by cytochalasin B. *J Biol Chem.* 247: 4102. -
62. Wilson L, Bamburg JR, Mizel SB, Grisham LM, Creswell KM.(1974) Interaction of drugs with microtubule proteins. *Federation Proc.*33: 158. -

63. Dustin PJR. (1963) New aspects of the pharmacology of antimetabolic agents. *Pharmacol Rev.* 15: 449.
64. Wilson L, Meza I. (1973) The mechanism of action of colchicine binding properties of Sea urchin sperm tail outer doublet tubulin. *J Cell Biol* 58: 709.
65. Sherline P, Leungy JT, Kipnis DM. (1975) Binding of colchicine to purified microtubule protein. *J Biol Chem* 54: 5481.
66. Taylor WI. (1975) The Catharanthus alkaloids. Botany, Chemistry and Clinical use. Fransworth NR. (Ed) Marcel Dekker New York.
67. Wilson L, Anderson K, Chin D. (1976) Nonstoichiometric poisoning of microtubule polymerization: A model for the mechanism of action of the vinca alkaloids, podophyllotoxin and colchicine. En: Cell motility. Goldman R, Pollard T, Rosenbaum J (Eds) Cold Spring Harbor Lab. p.1051.
68. Bensch KG, Malawista SE. (1969) Microtubular crystals in mammalian cells. *J Cell Biol.* 40: 95.
69. Wilson L, Bryan J, Ruby A, Mazia D. (1970) Precipitation of proteins by vinblastine and calcium ions. *Proc Natl Acad Sci USA.* 66: 807.
70. Bhattacharyya B, Wolff J. (1976) Tubulin aggregation and disaggregation mediated by 2 distinct vinblastine binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA.* 73: 2375.
71. Lui CW, Mrsny RJ, Meizel S. (1979) Procedures for obtaining high percentages of viable *in vitro* capacitated hamster sperm. *Gamete Res.* 2: 207.

72. Atherton RW, Radany EW, Polakoski KL. (1977) -  
Quantitation of human sperm motility. En: Techniques  
of Human Andrology, Hafez ESE (Ed) Vol. 1 Elsevier/  
North Holland, Amsterdam p. 173.
73. Rosado A, Mercado E, Gallegos AJ, Wens MA, Aznar R. -  
(1977) Subcellular distribution of lysosomal enzymes  
in the human endometrium. I. Normal menstrual cycle.  
Contraception 16: 287.
74. Obberghem E, Van Somers G, Devis GD, Vaughan GD, -  
Malaisse WJ, Malaisse-Lagae F, Orci L. (1973) Dynamics  
of insulin release and microtubular microfilamentous  
system. I. Effect of cytochalasin B. J Clin Invest.  
52: 1041.
75. Zurier RB, Hoffstein S, Weissmann G. (1973) Cytochala-  
sin B: Effect on lysosomal enzyme release from human  
leukocytes. Proc Natl Acad Sci USA. 70: 844.
76. Reyes A, Chavarría ME. ( Datos no publicados).
77. Somers G, Obberghem E, Van Devis G, Ravazzola M, -  
Malaisse-Lagae F, Malaisse WJ. (1974). Dynamics of -  
insulin release and microtubular microfilamentous -  
system. III. Effect of colchicine upon glucose-indu -  
ced insulin secretion. Europ J Clin Invest 4: 299.
78. Rosado A, Huacuja L, Delgado NM, Hicks JJ, Pancardo  
RM. (1975) Cyclic-AMP receptors in the human -  
spermatozoa membrane. Life Sci. 17: 1707.
79. Hernández Pérez O, Ballesteros LM, Rosado A. (1979) -  
Binding of  $^{17}\text{O}$ -estradiol to the outer surface and  
nucleo of human spermatozoa. Arch Androl. 3: 23.
80. Briggs MH, Briggs M. (1976) Biochemical Contraception  
Prospects for Human Development. London: Academic  
Press.

81. Cornett LE, Meizel S. (1978) Stimulation of *in vitro* activation and the acrosome reaction of hamster spermatozoa by catecholamines. Proc Natl Acad Sci USA. 75: 4954. -
82. Reyes A, Parra A, Chavarría ME, Goicoechea B, Rosado A. (1979) Effect of prolactin on the calcium binding and or transport of ejaculated and epididymal human spermatozoa. Fertil Steril 31: 669. -
83. Reyes A, Goicoechea B, Rosado A. (1978) Calcium ion requirement for rabbit spermatozoal capacitation and enhancement of fertilizing ability by ionophore A23187 and cyclic adenosine 3'-5'monophosphate. Fertil Steril. 29: 451. -
84. Huacuja L, Delgado NM, Merchant H, Pancardo RM, Rosado A. (1977) Cyclic AMP induced incorporation of <sup>33</sup>Pi into human spermatozoa membrane components. Biol Reprod. 17: 89. -