

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA.

EFFECTO DE INHIBIDORES DE LA FOSFODIESTERASA DEL AMPc
Y DE UN ANALOGO DEL AMPc (db-AMPc) SOBRE LA
CAPACITACION Y LA REACCION ACROSOMAL
EN CUYO (*Cavia porcella*).

T E S I S
que para obtener
el título de:
B I O L O G O
presenta:
FELIPE MACIEL MONCADA.

México, D. F.

1984.



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.

A mi madre y mi padre

A mis hermanos

A Hilda Mireya.

Mi sincero agradecimiento a la
Dra. Adela Mújica de Hernández,
del Departamento de Biología
Celular del Centro de Investi-
gación y Estudios Avanzados del
I. P. N., por su valiosa direc-
ción para el desarrollo del pre-
sente trabajo.

I N D I C E

	Pág.
Lista de abreviaturas	1
Lista de figuras	2
Lista de tablas	4
A. Introducción	6
I. Fertilización	6
II. Capacitación	13
III. Reacción acrosomal	17
IV. Nucleótidos cíclicos y su relación con los espermatozoides de mamífero	23
a. Efectos sobre la movilidad	23
b. Efectos sobre el metabolismo	25
V. AMP cíclico	27
B. Antecedentes	35
C. Objetivo	39
D. Material y métodos	41
i. Reactivos	41
ii. Medio de cultivo	41
iii. Obtención de los espermatozoides	42
iv. Lavado de los espermatozoides	43
v. Incubación de los espermatozoides	44
vi. Valoración de la capacitación y reacción acrosomal	46
vii. Parámetros estadísticos	47
E. Resultados	48
F. Discusión	70
G. Conclusiones	79
H. Bibliografía	80

L I S T A D E A B R E V I A T U R A S

AMP	Adenosín monofosfato
ATP	Adenosín trifosfato
GMPC	Guanosín-3',5'-monofosfato cíclico
AMPC	Adenosín-3',5'-monofosfato cíclico
dB-AMPC ó dbAMPC	Dibutiril adenosín-3',5'-monofosfato cíclico
8-Br-AMPC	8-Bromo adenosín-3',5'-monofosfato cíclico
PDE	Fosfodiesterasa del AMPC
IPDE	Inhibidor de la fosfodiesterasa del AMPC
MCM	Medio mínimo de cultivo
MIX	1-Metil-3-isobutil xantina
R.A.	Reacción acrosomal
P-2.5	Papaverina 2.5 μ M
P-5	Papaverina 5 μ M
P-10	Papaverina 10 μ M
A-2.5	Aminofilina 2.5 mM
A-5	Aminofilina 5 mM
A-10	Aminofilina 10 mM
MIX-0.1	1-Metil-3-isobutil xantina 0.1 mM
MIX-0.5	1-Metil-3-isobutil xantina 0.5 mM
x g	Número de veces la gravedad
mM	Milimolar
μ M	Micromolar

L I S T A D E F I G U R A S

	Pág.
Fig. 1. Representación esquemática de la gametogénesis en mamíferos	8
Fig. 2. Representación esquemática del espermatozoide de cuyo	9
Fig. 3. Secuencia de eventos involucrados en la fertilización en mamíferos	11
Fig. 4. Representación esquemática de la reacción acrosomal en el espermatozoide de cuyo	19
Fig. 5. AMP cíclico, así llamado debido a que el grupo fosfato, en su molécula, forma un anillo con los átomos de carbono a los que se encuentra enlazado	28
Fig. 6. Esquema hipotético de la regulación hormonal mediada por el AMPc	30
Fig. 7. Efecto de la aminofilina 2.5 mM sobre la reacción acrosomal en espermatozoides de cuyo	51
Fig. 8. Efecto de la aminofilina 5 mM sobre la reacción acrosomal en espermatozoides de cuyo	52

	Pág.
Fig. 9. Efecto de la 1-metil-3-isobutil-xantina (MIX-0.1) sobre la reacción acrosomal en espermatozoides de cuyo	54
Fig. 10. Efecto de la 1-metil-3-isobutil-xantina (MIX-0.5) sobre la reacción acrosomal en espermatozoides de cuyo	55
Fig. 11. Efecto de la papaverina 2.5 μ M sobre la reacción acrosomal en espermatozoides de cuyo	57
Fig. 12. Efecto de la papaverina 5 μ M sobre la reacción acrosomal en espermatozoides de cuyo	58
Fig. 13. Efecto de la papaverina 10 μ M sobre la reacción acrosomal en espermatozoides de cuyo	59
Fig. 14. Efecto de concentraciones bajas de AMPc, durante una preincubación corta, sobre la reacción acrosomal en espermatozoides de cuyo	64

L I S T A D E T A B L A S

	Pág
Tabla 1. Tiempo requerido para la capacitación de espermatozoides de mamífero <i>in vivo</i>	15
Tabla 2. Algunos ejemplos de actividades fisiológicas que tienen como factor común un incremento en la concentración interna del AMPc en el tejido ó célula blanco	34
Tabla 3. Tiempo de capacitación observado en presencia de los inhibidores de la fosfodiesterasa	49
Tabla 4. Efecto de concentraciones bajas de dbAMPc durante una preincubación de 5 minutos, con dilución a los 30 segundos iniciales, sobre la capacitación de los espermatozoides de cuyo	61
Tabla 5. Efecto de concentraciones bajas de dbAMPc durante una preincubación de 5 minutos, con dilución a los 30 segundos iniciales, sobre la reacción acrosomal en espermatozoides de cuyo	63

	Pág.
Tabla 6. Efecto de concentraciones altas de dbAMPc durante una preincubación de 5 minutos sobre la capacitación de los espermatozoides de cuyo	66
Tabla 7. Efecto de concentraciones altas de dbAMPc durante una preincubación de 5 minutos sobre la R.A. en espermatozoides de cuyo	67
Tabla 8. Tiempo de capacitación y porcentaje de R.A. en espermatozoides de cuyo, preincubados 5 minutos en MCM y transferidos a MCM más dbAMPc	69

A. INTRODUCCION

I. Fertilización

La fecundación, y el ulterior desarrollo ontogénico en las diversas especies animales es el principal mecanismo de perpetuación en las mismas. La fertilización consiste en una serie compleja y programada de eventos, que involucran a los gametos masculino y femenino, los cuales se generan vía los procesos de la espermatogénesis y la ovogénesis, respectivamente (Fig. 1), Bavister, 1980a.

En el hombre, los gametos se forman en los testículos, mediante un proceso controlado hormonalmente. En el momento del nacimiento, los testículos tienen células llamadas espermatogonias, precursoras de los espermatozoides. Desde entonces, hasta la pubertad, el testículo sólo muestra este tipo de células germinales. Esta estirpe celular se conserva por divisiones mitóticas, con baja frecuencia y, hacia la edad de 11-13 años bajo el control de ciertas hormonas, las espermatogonias comienzan a dividirse muy frecuentemente, produciendo millones de células hijas. Algunas de estas células comienzan a experimentar la meiosis y, como consecuencia, cada

una de ellas da lugar a cuatro espermatídes (Fig. 1). Posteriormente, éstas evolucionan hacia espermatozoides funcionales. Durante este proceso, el núcleo de la espermatíde se contrae, adquiere mayor densidad y forma la cabeza del espermatozoide; la mayor parte del citoplasma se desprende, y el aparato de Golgi se transforma en un organelo, denominado acrosoma, el cual desempeña un papel muy importante en el proceso de la fertilización. El centríolo proximal queda ubicado inmediatamente detrás del núcleo, mientras que el distal da origen al filamento axial; finalmente, las mitocondrias se disponen en la pieza media, quedando, así, conformado el espermatozoide (Fig. 2).

El proceso de la fertilización, en los animales, comienza estrictamente con la fusión de las membranas del espermatozoide con las del óvulo, culminando con la formación del cigoto. Para algunos investigadores, la formación del cigoto constituye el punto final de la fertilización, mientras que para otros, termina con la primera división mitótica del huevo.

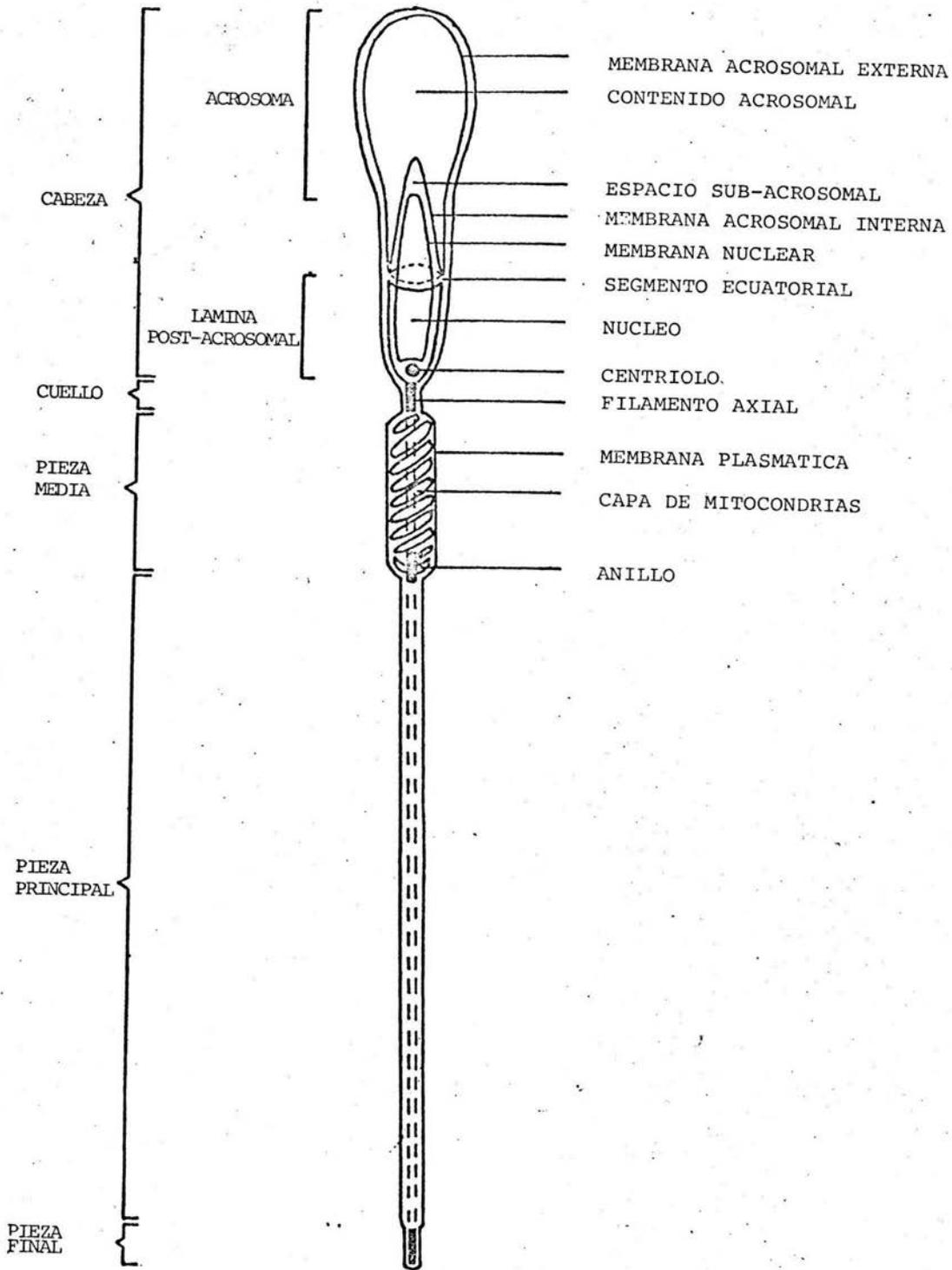


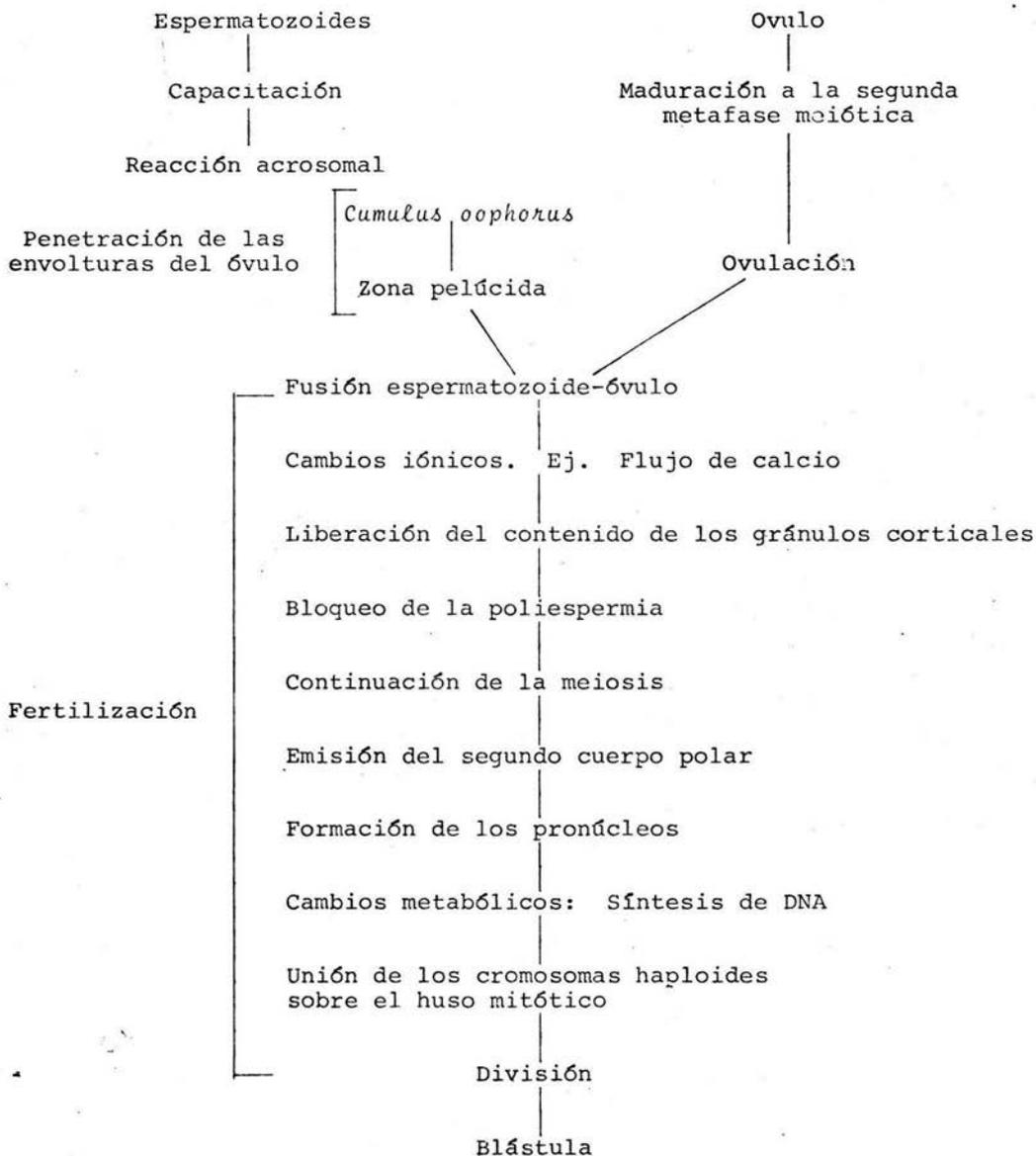
Fig. 2. Representación esquemática del espermatozoide de cuyo.

Los gametos de los mamíferos experimentan una serie de cambios, justo antes de la fertilización. En el ovocito, pierde rigidez la capa compacta de células de la granulosa, mientras que en el espermatozoide ocurren ciertos procesos bioquímicos y morfológicos, denominados capacitación y reacción acrosomal, respectivamente. Estos eventos, aun cuando no forman parte del proceso de la fertilización, constituyen prerequisites esenciales de la misma (Fig. 3). Bavister, 1980a.

Hasta la fecha, gran parte de los conocimientos referentes al proceso de la fertilización proceden de los estudios con invertebrados marinos, que exhiben fecundación externa. Estos organismos son ideales para el análisis en el laboratorio de los procesos de la fertilización, debido al gran número de gametos que liberan durante su etapa reproductora, en un medio ambiente semejante al de su hábitat natural (Bavister, 1980b).

Aun cuando las investigaciones con estos organismos continúan actualmente, la atención se ha dirigido hacia especies mamíferas, las cuales están más estrechamente relacionadas con el hombre. La comparación entre los resultados obtenidos con invertebrados marinos y con vertebrados mamíferos

Fig. 3. Secuencia de eventos involucrados en la fertilización en mamíferos



arroja como conclusión una serie de diferencias que se deben probablemente al tipo de fecundación. Además, puesto que la fertilización en los mamíferos es interna, ésto hace más difíciles los estudios *in vivo*.

La diferencia principal que se ha observado entre los invertebrados marinos y los vertebrados mamíferos, es que en los primeros no ocurre la capacitación, sino que la reacción acrosomal se manifiesta de manera casi instantánea al hacer contacto el espermatozoide con los componentes de la capa gelatinosa (Bavister, 1980b). Sin embargo, es importante hacer notar que en ciertas especies del Phylum Cnidaria (*Campanularia flexuosa*), en las cuales ocurre fecundación interna, se ha observado un fenómeno semejante al de la capacitación (O'Rand, 1972).

Es indudable que durante el transcurso de la evolución se tuvieron que resolver toda clase de problemas fisiológicos y bioquímicos para conseguir que los gametos llegaran a encontrarse y fusionarse. Evidentemente, la reproducción sexual tiene muchas ventajas biológicas sobre el tipo de reproducción asexual, ya que permite una mayor recombinación y variabilidad genética, las

cuales aumentan las probabilidades de la supervivencia y adaptación en las diversas poblaciones animales. Asimismo, parece que la capacitación es una adaptación evolutiva que se desarrolló paralelamente al proceso de la fecundación interna en los mamíferos, y puede ser considerada como un medio efectivo de selección de gametos durante el transporte de los espermatozoides a través de las diferentes regiones del tracto reproductor femenino. Los eyaculados de mamífero representan una población heterogénea de células, en la cual un número de espermatozoides con diferentes estadios de maduración, son depositados en el tracto femenino. La capacitación puede ser, por lo tanto, un mecanismo delicado donde sólo el espermatozoide en el estadio óptimo de su proceso de maduración puede penetrar al óvulo (Chang y Hunter, 1975).

II. Capacitación

Se ha observado en muchas especies de vertebrados que, durante la etapa de la reproducción, los espermatozoides del macho son depositados dentro del tracto reproductor femenino, donde tiene lugar la fertilización. Por otra parte, Austin (1951) y

Chang (1951) comunicaron de manera simultánea e independiente, la observación de que los espermatozoides de conejo no fertilizaban inmediatamente el óvulo respectivo, después de inseminar a la hembra. Posteriormente, Austin (1952) al período de estancia en el tracto reproductor femenino, necesario para que el espermatozoide adquiriera la capacidad de fertilizar al óvulo, lo denominó capacitación.

Sin embargo, otros estudios posteriores demostraron que la capacitación, per se, del espermatozoide no lo habilita para fertilizar al óvulo, sino que es tan sólo un evento previo para la ocurrencia de otro fenómeno involucrado en la fertilización y el cual se conoce como reacción acrosomal.

En la actualidad se considera a la capacitación como aquella serie de eventos que preparan el espermatozoide para la ocurrencia de la reacción acrosomal (Bedford, 1970). El tiempo que dura este proceso varía considerablemente entre las diversas especies (Watkin, 1976), Tabla 1.

Los mecanismos bioquímicos directamente responsables del proceso de la capacitación no han sido bien esclarecidos hasta la fecha. Empero, los eventos

TABLA 1. TIEMPO REQUERIDO PARA LA CAPACITACION DE
 ESPERMATOZOIDES DE MAMIFERO *IN VIVO**

Especie	Tiempo (Horas)
Ratón	< 1
Oveja	1.5
Rata	2 - 3
Hamster	2 - 4
Cerdo	3 - 6
Hurón	3.5 - 11.5
Conejo	5
Rhesus	5 - 6
Hombre	5 - 6

*Tomado de Austin, 1974.

que, se han sugerido, ocurren durante este fenómeno y que permiten la subsecuente reacción acrosomal son: la pérdida de proteínas estabilizantes de la superficie del espermatozoide (Oliphant y Brackett, 1973); cambios en la fluidez de la membrana (O'Rand, 1977); incremento en los fosfolípidos de la membrana (O'Rand, 1982); incremento en el nivel intracelular de AMPc (Rogers y García, 1979). Los datos que parecen apoyar este último punto son los obtenidos por Fraser en 1981, quien observó que el dbAMPc disminuye el tiempo de capacitación en espermatozoides de ratón. Por otra parte, los resultados obtenidos por Hicks et al. (1972a, 1972b) sugieren que el AMPc y el fluido folicular favorecen la capacitación en espermatozoides de hombre. Otros autores (Hyne y Garbers, 1981) han demostrado que es necesaria la presencia de factores séricos para que ocurra la capacitación de espermatozoides de cuyo, en incubaciones a pH menor de 7.8. Por otra parte, se ha demostrado que el tiempo necesario para que se efectúe la capacitación, *in vitro*, es dependiente de la naturaleza de los sustratos energéticos adicionados al medio de incubación (Rogers y Yanagimachi, 1975b).

Finalmente, otros autores se han avocado a la tarea de elucidar la secuencia de los eventos bioquímicos que ocurren durante la capacitación (Meizel, 1978; Yanagimachi, 1977). De los diversos estudios efectuados con mamíferos se puede concluir que la capacitación es una condición indispensable para la ocurrencia subsecuente de la reacción acrosomal y la ulterior fertilización.

Como se mencionó anteriormente, el término capacitación se ha definido de varias formas, pero en el presente trabajo se establecerá como aquél período de tiempo que debe ser incubado el espermatozoide, *in vitro*, antes de que se lleve a cabo la reacción acrosomal (Garbers y Kopf, 1980; Hyne y Garbers, 1979a)

III. Reacción acrosomal

El acrosoma del espermatozoide de mamífero es un organelo que se encuentra ubicado en la región anterior de la cabeza del espermatozoide y contiene enzimas hidrolíticas, como la hialuronidasa (Rogers y Yanagimachi, 1975a) y la acrosina (Green, 1978), las cuales desempeñan un papel importante durante el proceso de la fertilización. Este organelo está constituido, en general, por una

membrana externa, el contenido acrosomal, la membrana interna, y el segmento ecuatorial (Meizel, 1978). Figs. 2 y 4a.

Una vez que el espermatozoide se ha capacitado, se lleva a efecto la reacción acrosomal, la que ocurre en la proximidad o en la capa externa del huevo (Green, 1978). Yanagimachi y Usui (1974) han sugerido que este suceso puede iniciarse en el borde apical de la cabeza del espermatozoide (Fig. 4b). Este fenómeno consiste, básicamente, en una fusión y vesiculación progresivas que involucran a la membrana acrosomal externa y a la membrana plasmática que la cubre, lo cual tiene como consecuencia la liberación de las enzimas hidrolíticas del acrosoma. Finalmente, se fusionan la membrana externa acrosomal residual y la membrana plasmática, en la región anterior del segmento ecuatorial, lo que permite la continuidad de la membrana del espermatozoide (Meizel, 1978), Figs. 4c y 4d.

Yanagimachi y Usui (1974) demostraron que la reacción acrosomal, pero no la capacitación, es dependiente de calcio exógeno. Así, ellos sugirieron que el incremento en el calcio libre del citoplasma ocasiona la fusión de la membrana

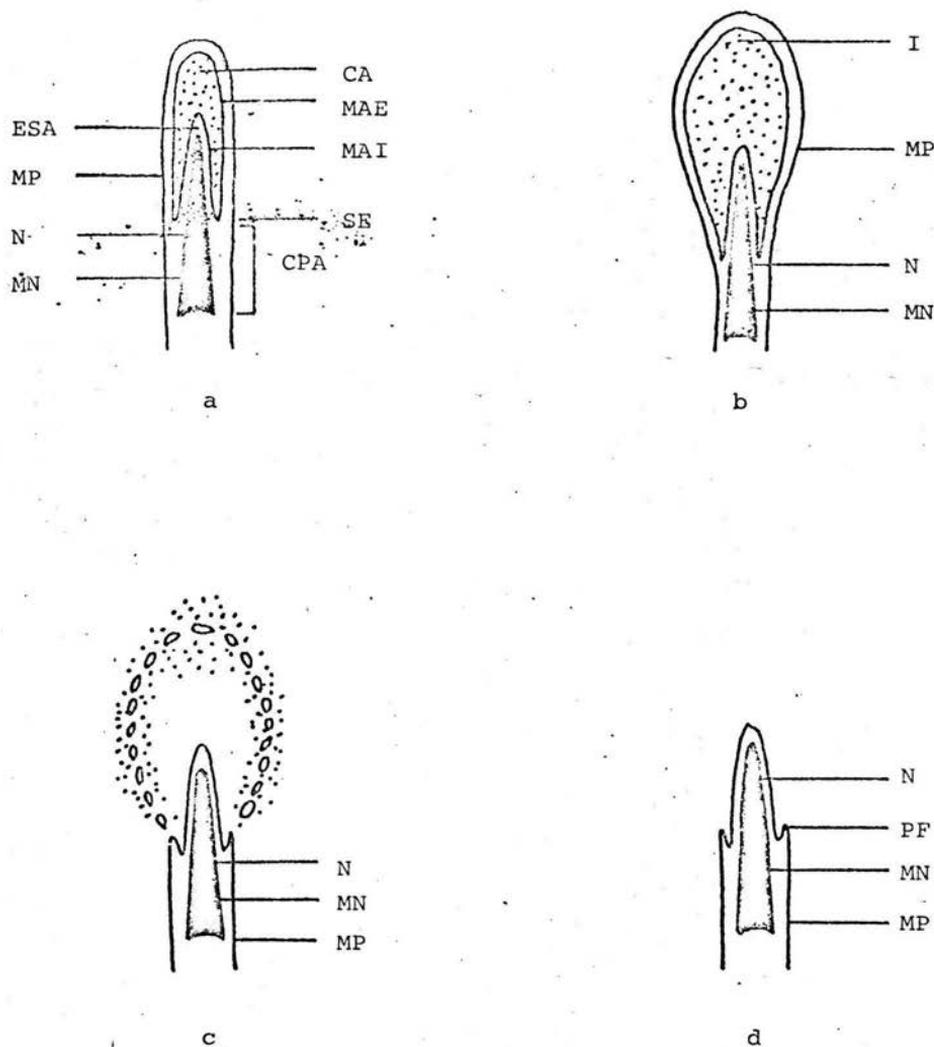


Fig. 4. Representación esquemática de la reacción acrosomal en el espermatozoide de cuyo

Fig. 4. Representación esquemática de la reacción acrosomal en el espermatozoide de cuyo.

- a. Cabeza del espermatozoide de cuyo, donde se puede observar claramente el acrosoma. C A - Contenido acrosomal no enlazado a la membrana. M A E - Membrana acrosomal externa. M A I - Membrana acrosomal interna. E S A - Espacio sub-acrosomal. M P - Membrana plasmática. N - Núcleo. M N - Membrana nuclear. S E - Segmento ecuatorial o collar acrosomal. C P A - Cubierta o lámina post-acrosomal.
- b. La reacción acrosomal puede ser iniciada en la región apical del acrosoma (I).
- c. La fusión y la vesiculación que ocurren entre la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática, permiten la liberación del contenido soluble del acrosoma.
- d. Después de la reacción acrosomal, las vesículas son arrojadas exponiendo así las enzimas enlazadas a la membrana acrosomal interna. P F - Punto de fusión de la membrana acrosomal externa residual con la membrana plasmática a lo largo del

límite anterior del segmento ecuatorial.
Esta fusión estable le permite al
espermatozoide permanecer rodeado por una
membrana continua simple.

plasmática y la membrana acrosomal. Uno de los mecanismos propuestos por estos autores para la ocurrencia de la fusión de las membranas, consiste en que la entrada del calcio a la célula ocasiona un hinchamiento del acrosoma y éste, a su vez, provoca el acercamiento de la membrana acrosomal a la membrana plasmática (Fig. 4b). Esta tesis fue apoyada por otros estudios efectuados con el ionóforo A23187, el cual provoca reacción acrosomal en presencia de calcio (Green, 1978).

Se ha comunicado que la fructosa y la glucosa retardan la reacción acrosomal de los espermatozoides de cuyo, capacitados *in vitro*, con piruvato y lactato como substratos (Rogers y Yanagimachi, 1975b). Por otra parte, Fraser y Quinn (1981) encontraron que la glucosa, pero no el piruvato, ni el lactato, es necesaria para iniciar la reacción acrosomal en espermatozoides de ratón.

Rogers y García (1979) observaron que la reacción acrosomal en el cuyo se inhibe debido a las altas concentraciones de AMPc. Por el contrario, otros autores (Hyne y Garbers, 1979b) lograron provocar la reacción acrosomal, bajo las mismas condiciones de ensayo, en espermatozoides de cuyo, vía

concentraciones altas de AMPc. Se ha sugerido, además, que la reacción acrosomal puede ocurrir debido a un incremento en la relación GMPc/AMPc (Santos-Sacchi y Gordon, 1970), o bien, a la presencia de proteínas del medio externo, como la albúmina (Berger y Clegg, 1983).

IV. Nucleótidos cíclicos y su relación con los espermatozoides de mamífero

- a. Efectos sobre la movilidad. La observación inicial de que los nucleótidos cíclicos desempeñan un papel importante en la movilidad de los espermatozoides de mamífero fue comunicada por Garbers et al, 1971. Se sabe que el espermatozoide contiene AMPc, GMPc (Morton y Albagli, 1973; Cascieri et al, 1976; Garbers et al, 1971; Hyne y Garbers, 1979a), y las enzimas necesarias para la síntesis, degradación y expresión de estos nucleótidos (Cascieri et al, 1976; Hyne y Garbers, 1979b; Morton y Albagli, 1973; Braun, 1975; Mann y Lutwak-Mann, 1981).
- Los primeros estudios que relacionaron la movilidad del espermatozoide con los nucleótidos cíclicos mostraron que los inhibidores

de la PDE, la cafeína, teofilina y papaverina, así como también el dbAMPC, mantuvieron la movilidad de espermatozoides de bovino hasta por un período de cuatro horas, mientras que el imidazol, un activador de la PDE, inhibió la movilidad. El hecho de que la movilidad fue mejorada sólo ocasionalmente por el AMPC y de manera muy poco notable por otros nucleótidos cíclicos, llevó a algunos autores (Garbers et al., 1971) a sugerir la existencia de una barrera de permeabilidad celular a estos nucleótidos. Posteriormente, se observaron efectos similares de los inhibidores de la PDE y del AMPC, así como de los análogos de éste, en otras especies animales. Así, se ha demostrado una estimulación de la movilidad en espermatozoides de cuyo (Garbers et al., 1982; Frenkel et al., 1973), bovino (Garbers et al., 1971; Hoskins, 1973), rata (Turner y Giles, 1982), toro (Lindemann, 1978), primates (Hoskins et al., 1971) y en el del hombre (Gorus et al., 1982; Hicks et al., 1972a, 1972b). Por otra parte, se ha sugerido que el calcio (Hyne y Garbers, 1979a, 1979b; Yanagimachi y Usui, 1974) y el bicarbonato (Garbers et al., 1982) están involucrados

en la estimulación de la movilidad vía activación de la adenilciclase y el incremento en el nivel de AMPc. No se sabe si el calcio activa la movilidad directamente o utiliza al AMPc como mensajero, o bien, efectúa ambos procesos, pero lo más probable es que el calcio y el AMPc modulen la movilidad del espermatozoide bajo condiciones fisiológicas.

b. Efectos sobre el metabolismo. Las relaciones entre el AMPc y la movilidad de los espermatozoides es evidente, pero el mecanismo por el cual los nucleótidos cíclicos afectan dicha movilidad no está claro. Para ello, se han establecido tres proposiciones sobre su efecto:

1. Existen efectos directos del AMPc intracelular sobre el sistema flagelar.
2. El AMPc intracelular provoca la activación de una proteincinasa dependiente del mismo con fosforilación de una proteína asociada a la movilidad.
3. Ocurren efectos directos del AMPc extracelular a nivel de la membrana lo cual provoca efectos posteriores sobre el transporte iónico y la movilidad. (Garbers y Kopf, 1980).

En presencia de substratos exógenos, la velocidad de la respiración en el espermatozoide de mamífero es estimulada por metilxantinas, AMPc o análogos de éste (Garbers et al., 1971a; Li, 1972; Hicks et al., 1972b). Además de los efectos sobre la respiración se ha demostrado que los inhibidores de la PDE y el AMPc estimulan la glucólisis en espermatozoides de toro (Cascieri et al., 1976), cuyo (Frenkel et al., 1973), y bovino (Hoskins, 1973; Garbers et al., 1971a).

Por otra parte, paralelo a la estimulación de la movilidad por metilxantinas o AMPc en espermatozoides de bovino se ha observado un decremento en las concentraciones de ATP (Garbers et al., 1971a, 1971b; Hoskins, 1973; Hoskins y Casillas, 1975b; Frenkel et al., 1973). Para explicar lo anterior Hoskins y Casillas (1975a) sugirieron la siguiente secuencia de eventos, después de la adición de metilxantinas al medio de incubación de espermatozoides de bovino: una elevación en el nivel de AMPc; inducción de la movilidad con un incremento resultante en los requerimientos energéticos celulares; una disminución

en el nivel de ATP y en la carga energética y, finalmente, una elevación en la velocidad respiratoria o en la fructólisis. La naturaleza de los sitios enzimáticos de la fructólisis, afectada por la cafeína o el dbAMPc, no está muy clara. Sin embargo, existe un reporte que sugiere que este control es ejercido al nivel del gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa o de la fosfoglicerato-cinasa (Hoskins, 1973).

V. AMP cíclico

Una molécula que desempeña un papel regulatorio en la velocidad de procesos bioquímicos en organismos tan lejanamente relacionados, en el aspecto evolutivo, como son las bacterias y el hombre, es el adenosín-3',5'-monofosfato cíclico o AMPc (Pastan, 1972; Makman y Sutherland, 1965). La palabra cíclico se refiere al hecho de que los átomos del grupo fosfato tienen un arreglo en forma anular (Fig. 5). Esta molécula actúa como mensajero químico, regulando las reacciones enzimáticas en las células que almacenan azúcares y grasas; también estimula la transcripción de operones inducibles en *E. coli* y afecta, además, el crecimiento de células tumorales en cultivo de

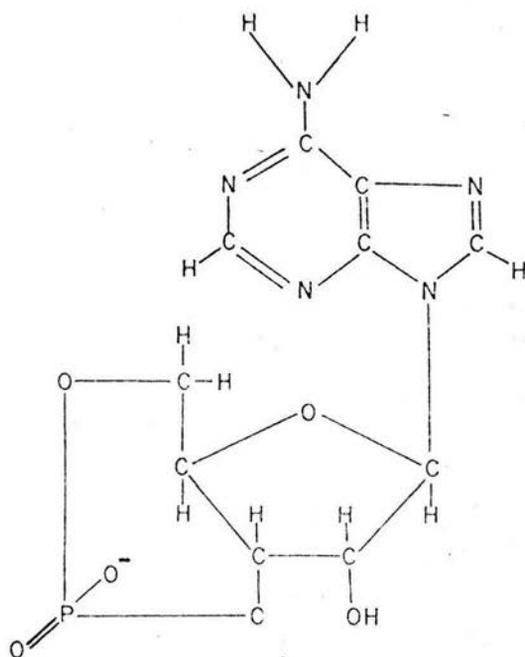
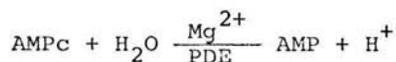
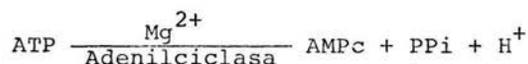


Fig. 5. AMP cíclico, así llamado debido a que el grupo fosfato, en su molécula, forma un anillo con los átomos de carbono a los que se encuentra enlazado.

tejidos (Pastan, 1972).

El AMPc se forma a partir del ATP por la acción de la enzima adenilciclase, la cual está ligada a la membrana de la célula. Normalmente, su actividad es baja y la transformación de ATP a AMPc, por medio de la hidrólisis del pirofosfato, ocurre a velocidad bastante baja. El AMPc, a su vez, es hidrolizado por una fosfodiesterasa específica, liberándose como producto final el AMP. Así:



En la figura 6 se muestra el concepto generalizado por medio del cual, se ha sugerido, ciertas hormonas regulan la función celular. Este esquema involucra los conceptos del segundo mensajero, establecidos por Sutherland et al (Hoskins y Casillas, 1975a, 1975b). Así, cuando una hormona es liberada al torrente sanguíneo, actúa como un primer mensajero; se dirige en seguida hacia la célula blanco y se enlaza a los sitios receptores específicos de la misma. Este enlace provoca un incremento en la actividad de la adenilciclase.

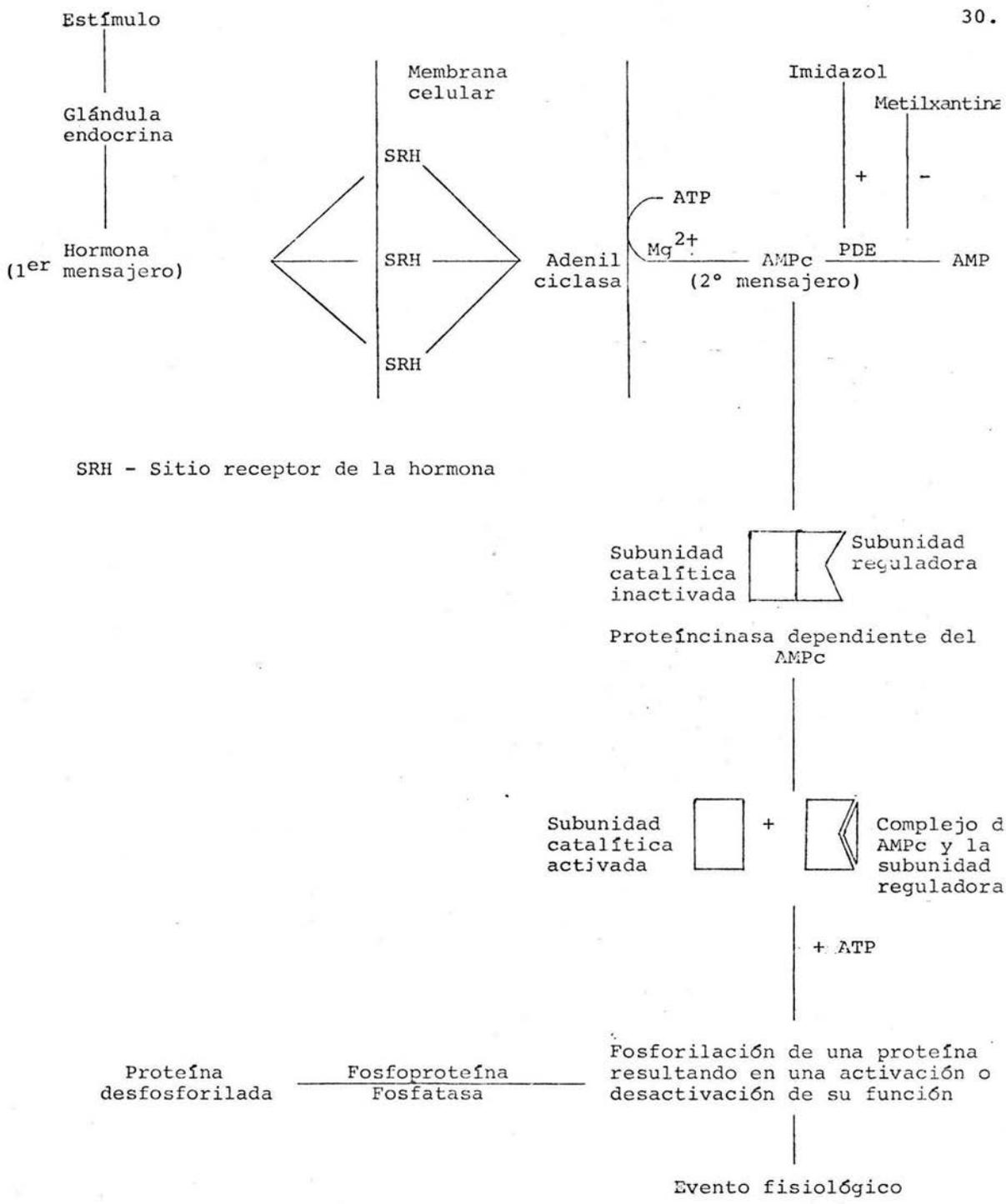


Fig. 6. Esquema hipotético de la regulación hormonal mediada por el AMPC

Como consecuencia de ésto, se produce AMPc, utilizando el suministro de ATP endógeno. El AMPc se difunde libremente a través de la célula y actúa como un segundo mensajero, induciendo para que responda en una forma característica (Pastan, 1972). Los niveles intracelulares del AMPc dependen de sus velocidades de síntesis y degradación. Así, en muchas células la conversión del AMPc a AMP es catalizada por la acción de una o más enzimas, conocidas como fosfodiesterasas del AMPc (Stephens et al., 1979; Hoskins y Casillas, 1975a; Garbers et al., 1971). Estas enzimas son aceleradas por el imidazol e inhibidas por metilxantinas (Garbers y Kopf, 1980; Mann y Lutwak-Mann, 1981; Hoskins y Casillas, 1975a, 1975b). En los espermatozoides de mamífero, el metabolismo y funcionamiento del AMPc está relacionado con el funcionamiento de varias enzimas que son: La fosfodiesterasa del AMPc la cual provoca la conversión de éste hacia AMP; la proteínasa dependiente del AMPc, constituida por una subunidad catalítica y una subunidad reguladora; y una fosfoproteína fosfatasa, la cual desfosforila el producto de la fosforilación de la proteína (Mann y Lutwak-Mann, 1981).

Un aspecto importante del sistema del segundo mensajero es que la hormona no necesita entrar en la célula. Su efecto se realiza sobre la membrana celular y sus consecuencias biológicas van mediadas, dentro de la célula, por el AMPc. En la práctica, se utilizan varios criterios experimentales, antes de que el sistema del segundo mensajero pueda ser aceptado como una parte esencial de cualquier proceso (Singhal y Sutherland, 1975; Hoskins y Casillas, 1975a). Se debe demostrar que:

- a) El efector activa específicamente a la adenilciclase en las preparaciones celulares.
- b) El efector debe alterar las concentraciones intracelulares de AMPc, bajo condiciones fisiológicas, y la respuesta al AMPc debe preceder al proceso.
- c) Los inhibidores de la PDE deben actuar sinérgicamente con el efector.
- d) Los efectos biológicos del efector deben ser imitados por la adición de AMPc o de sus análogos. Sin embargo, se ha observado que el AMPc no penetra fácilmente en las células, por lo cual se utilizan derivados menos polares del mismo, como el dbAMPc o el

8-Br-AMPC, los cuales entran en la célula y son activos (Garbers et al., 1971).

Experimentos basados en los criterios antes mencionados, han demostrado que el AMPC es el segundo mensajero en varios procesos biológicos (Pastan, 1972), Tabla 2.

El hecho más notable, hasta ahora, es que ninguna hormona, el primer mensajero en otras células, ha mostrado provocar una respuesta fisiológica en los espermatozoides de mamífero y provocar una alteración en la concentración de AMPC.

(Hoskins y Casillas, 1975a; Mann y Lutwak-Mann, 1981).

HORMONA (S)	TEJIDO	RESPUESTA PRINCIPAL
Hormona estimulante de melanocitos (MSH)	Piel de rana	Oscurecimiento de la piel
Hormona paratiroidea	Hueso	Reabsorción de calcio
Glucagon, epinefrina	Hígado	Glucogenólisis
Epinefrina	Músculo	Glucogenólisis
Norepinefrina	Cerebro	Descarga de las células de Purkinje
Hormona luteinizante (LH)	Ovarios	Secreción de progesterona
Epinefrina	Corazón	Incremento en las contracciones
Epinefrina, norepinefrina, glucagon, ACTH	Adipocitos	Lipólisis
Hormona antidiurética (ADH)	Riñon	Reabsorción de agua

TABLA 2. Algunos ejemplos de actividades fisiológicas que tienen como factor común un incremento en la concentración interna del AMPc en el tejido o célula blanco.

B. ANTECEDENTES

Se ha establecido que durante la capacitación del espermatozoide ocurren incrementos en la respiración, glucólisis y la movilidad de dicha célula, aun cuando los mecanismos bioquímicos asociados con estos procesos no están bien esclarecidos. Los efectos similares que tienen los nucleótidos cíclicos y los inhibidores de la PDE sobre los espermatozoides han llevado a sugerir que aquéllos están involucrados en los procesos de la capacitación o la reacción acrosomal o en ambos (Casieri et al., 1976; Frenkel et al., 1973; Garbers et al., 1971, 1982; Reyes et al., 1978; Gorus, 1982). De varios estudios realizados en espermatozoides de cuyo se ha comunicado que con la adición al medio de incubación (MCM), de AMPc o análogos del mismo, así como de inhibidores de la PDE, se afecta de alguna manera la capacitación o la reacción acrosomal. Así, Hyne y Garbers (1979a) han reportado resultados que sugieren que la elevación en el nivel de AMPc no induce por sí misma la reacción acrosomal en espermatozoides de cuyo, sino que al parecer desempeña un papel secundario en la misma. Estos autores observaron un incremento notable, dependiente de calcio,

en las concentraciones intracelulares de AMPc durante los primeros 30 segundos, en diferentes medios de incubación (MCM ó Biggers).

El inicio de la reacción acrosomal ocurrió a diferentes tiempos de incubación en los distintos medios siempre que los espermatozoides estuvieran previamente capacitados. Estos resultados sugieren que la reacción acrosomal está asociada con un transporte primario de calcio y un incremento, dependiente del mismo, en la concentración intracelular de AMPc, ya que ni el 8-Br-AMPc, ni la MIX provocaron la reacción acrosomal en espermatozoides capacitados en un medio sin calcio. Empero, ambos compuestos disminuyeron el tiempo de capacitación en ausencia del calcio. Estos resultados concuerdan con los reportados por Fraser (1981), quien observó que al adicionar dbAMPc al medio de incubación o incrementando el nivel endógeno de AMPc, por adición de cafeína al medio de incubación, se disminuyó notablemente el tiempo de la capacitación en espermatozoides de ratón.

Por otra parte, Rogers y García (1979), reportaron resultados en los que se observa que con la adición al medio de incubación (MCM) de cantidades milimolares (1 a 10) de dbAMPc o de inhibidores de la PDE, cafeína MIX y teofilina, se inhibe la reacción acrosomal en

espermatozoides de cuyo. Estos autores sugirieron que la reducción de los niveles intracelulares de AMPc puede ser parte del mecanismo de la capacitación o de la reacción acrosomal. En nuestro laboratorio se han llevado a cabo experimentos en los que se ha observado que en los espermatozoides de cuyo preincubados durante 5 minutos en una solución de Tyrode, semejante a la solución Biggers utilizada por Hyne y Garbers (1979), la reacción acrosomal se inicia dentro de los 15 minutos posteriores a la transferencia de los espermatozoides a MCM. Asimismo, se ha observado que con el mismo período de 5 minutos de preincubación de los espermatozoides en una solución de MCM, no ocurre la reacción acrosomal en el intervalo de 15 minutos subsecuentes a la transferencia de los espermatozoides a MCM.

De los datos aportados por Hyne y Garbers (1979a), se observa que el nivel intracelular inicial de AMPc a los 30 segundos de incubación en la solución de Biggers es dos veces mayor que el nivel de AMPc que se alcanza en la solución MCM. Se podría cuestionar si esta elevación intracelular inicial de AMPc está relacionada con el tiempo de preincubación tan corto que requieren los espermatozoides en la solución de Tyrode, para la posterior ocurrencia de la reacción acrosomal.

De lo anteriormente mencionado, es evidente que hasta ahora no existen evidencias concretas y convincentes que demuestren que la adenilciclase y su producto, el AMPc, desempeñan su papel de segundo mensajero durante la capacitación o la reacción acrosomal en los espermatozoides de cuyo.

C. O B J E T I V O

El propósito del presente trabajo es contribuir, de alguna manera, a las investigaciones y resultados obtenidos anteriormente por otros autores y tratar de definir el posible papel del AMPc en la capacitación y la reacción acrosomal de los espermatozoides de cuyo.

Para llevar a cabo ésto, se fijaron los siguientes objetivos:

- a) Examinar el efecto inicial de uno de los inhibidores de la PDE, probados por Hyne y Garbers (1979) y por Rogers y García (1979), la MIX, sobre la capacitación.
- b) Determinar el efecto de otros diferentes inhibidores de PDE, la aminofilina y la papaverina, éste último uno de los más potentes inhibidores de PDE, hasta ahora probados, sobre la capacitación.
- c) Determinar si existe una correlación entre las diferentes concentraciones iniciales de AMPc y el tiempo de capacitación. Las evidencias se obtuvieron, de manera indirecta, adicionando los inhibidores de PDE del AMPc, así como un análogo de este último, el dbAMPc,

a un medio de incubación definido, el MCM,
que permite la capacitación y la expresión
de la reacción acrosomal de los espermatozoides
de cuyo.

D. MATERIAL Y METODOS

i) Reactivos

Los reactivos en el presente estudio fueron obtenidos de las siguientes casas comerciales: piruvato de potasio, lactato de sodio, (teofilina)₂-etilen-diamina (Aminofilina), 6,7-dimetoxi-1-veratrylisoquinolina (Papaverina), N⁶,O²-dibutiriladenosina-3',5'-monofosfato cíclico (dbAMPC) de Sigma Chemical Co.; cloruro de sodio, cloruro de calcio y bicarbonato de sodio de J.T. Baker; 1-metil-3-isobutilxantina (MIX) de Aldrich Chemical Co.; pentobarbital de sodio (Anestosal) de Smith Kline Norden de México.

ii) Medio de cultivo

Se utilizó el medio mínimo de cultivo (MCM) descrito por Barros en 1974 (Rogers y Yanagimachi), 1975b). En su preparación se omitieron la albúmina y la glucosa. Su composición es la siguiente: cloruro de sodio 105.08 mM; cloruro de calcio 1.71 mM; bicarbonato de sodio 25.07 mM; piruvato de potasio 0.25 mM; lactato de sodio 20.0 mM. El pH de esta solución se ajustó a 7.8 con hidróxido de sodio 0.1 N o con ácido clorhídrico 0.1 N.

iii) Obtención de los espermatozoides

Se utilizaron cuyos de la especie *Cavia porcella*, debido a que el acrosoma de sus espermatozoides es lo suficientemente grande para poder ser observado fácilmente al microscopio de luz (Meizel, 1978).

Los cuyos, de más de 750 g. de peso, fueron anestesiados por vía intraperitoneal con 1 ml de anestésico por kg de peso. Se extrajeron los testículos unidos a los conductos deferentes, pinzándolos por los extremos, cerca de las glándulas seminales. Luego se ligaron los conductos por el lado proximal a los extremos pinzados y se colocaron rápidamente en un matraz con solución salina de NaCl al 0.9% incluido en un baño de agua a 37°C.

En seguida, se disecaron los conductos deferentes, evitando simultáneamente que se enfriaran, bañándolos con la solución salina.

Finalmente, se les hizo una pequeña incisión cerca del extremo ligado y se introdujo una cánula por esta abertura para empujar los espermatozoides fuera del conducto, con una inyección 2 ml de NaCl al 0.9% a 37°C, y se recogieron los espermatozoides por el extremo unido al epidídimo, el cual fue

cortado inmediatamente antes de la inyección de la solución salina.

iv) Lavado de los espermatozoides

Los espermatozoides de cada conducto deferente fueron colectados en un tubo de ensaye. Luego se observaron las diferentes muestras al microscopio para su selección y se utilizaron únicamente aquéllas en las que se observó buena movilidad de los espermatozoides y que además no estuvieron contaminadas por otras células.

Las muestras seleccionadas se centrifugaron a 600 x g/5 min., a temperatura ambiente. Luego se les añadió 0.5 ml de la solución salina a 37°C a cada una de las pastillas y éstas se resuspendieron de una a otra hasta contenerlas todas en un sólo tubo de ensaye. En seguida se centrifugó esta muestra a 600 x g/5 min., y a la pastilla resultante se adicionó 2 ml de la solución salina a 37°C. Después, se procedió a tomar una muestra alícuota de 50 μ l de esta mezcla para diluirlos en 1 ml de Tritón X-100, ésto último con la finalidad de disolver los acrosomas y separar los espermatozoides. En seguida se agitó en un Vortex y se extrajo una pequeña muestra alícuota para determinar el número de espermatozoides en una cámara Neubauer.

Finalmente, se ajustó el número de espermatozoides a una concentración de 35×10^6 células/ml de solución salina.

v) Incubación de los espermatozoides

La incubación de los espermatozoides se efectuó en un baño de agua a 37°C . Las suspensiones de espermatozoides lavadas con la solución salina y ajustadas a la concentración de 35×10^6 células/ml., se centrifugaron a $600 \times g/5$ min., se desecharon los sobrenadantes y a las pastillas se les añadió un volumen de MCM, similar al del sobrenadante desechado.

Durante los experimentos con los inhibidores de la PDE, una de las muestras de MCM (1 ml) se mantuvo intacta, grupo control, mientras que de las demás muestras se tomaron alícuotas a las cuales se les adicionaron determinados volúmenes de aminofilina, MIX o de papaverina para obtener un volumen final de 1 ml de MCM más el inhibidor de la PDE respectivo. Los inhibidores de la PDE fueron disueltos previamente en MCM para obtener finalmente las concentraciones requeridas. En los experimentos con dbAMPc se mantuvo, nuevamente, una muestra de espermatozoides en MCM intacta (1 ml) mientras que por otra parte se mantuvieron unas muestras de 0.1

ml de MCM más dbAMPC, a diferentes concentraciones (28 a 140 μ M), durante un periodo de 30 segundos, luego del cual se les añadieron 0.9 ml de MCM y se mantuvieron así durante un lapso de 5 minutos. En seguida, se extrajeron muestras alícuotas de 0.5 ml de los diversos medios y se centrifugaron a 600 x g/5 min. Se desecharon los sobrenadantes y a las pastillas se les adicionó un volumen de MCM, similar al del sobrenadante. A estas muestras se les denominó muestras transferidas. Al resto de las muestras de espermatozoides sin centrifugar se les denominó muestras control.

Se llevaron a cabo otros experimentos con concentraciones altas (1 y 5 mM) de dbAMPC, pero en esta ocasión se incubaron las muestras de MCM y de MCM más dbAMPC durante un periodo de 5 minutos, luego del cual se extrajeron muestras alícuotas de 0.5 ml de cada uno de los medios y se centrifugaron a 600 x g/5 min. Se desechó el sobrenadante y a la pastilla se le adicionó un volumen de MCM, similar al del sobrenadante. A estas muestras las denominamos muestras transferidas, mientras que a las muestras sin centrifugar las denominamos muestras control.

Finalmente, en la última serie de experimentos con dbAMPc, los espermatozoides fueron preincubados durante un período de 5 minutos en MCM y luego se tomaron muestras alícuotas para centrifugarlas a $600 \times g/5 \text{ min.}$ Se desecharon los sobrenadantes y las pastillas se resuspendieron en MCM o en MCM más dbAMPc, en los mismos volúmenes que los sobrenadantes desechados. A estos medios los denominamos medios de transferencia, mientras que al medio de preincubación (MCM) sin centrifugar lo denominamos medio control. En todos los casos, el dbAMPc fue previamente disuelto en MCM para obtener las concentraciones indicadas.

vi) Valoración de la capacitación y de la reacción acrosomal

En el presente trabajo la capacitación de los espermatozoides se estableció como aquel período de tiempo que transcurrió a partir del inicio de la incubación (experimentos con IPDE), o bien, luego de la transferencia de los espermatozoides (experimentos con dbAMPc), hasta la observación del inicio de la reacción acrosomal. Por otra parte, la valoración cualitativa de la reacción acrosomal se llevó a cabo mediante la observación, al microscopio, de espermatozoides con las

características propias de la R.A. es decir, espermatozoides sin acrosoma, muy activos en su movimiento y con una agitación vigorosa, en forma de látigo, de su flagelo. Mientras que la valoración cuantitativa de la R.A. se llevó a cabo fijando muestras alícuotas, durante el transcurso de la incubación, y a tiempos determinados, con formaldehído al 3%. El conteo posterior de las muestras fijadas se efectuó contando dos veces, un mínimo de 200 espermatozoides en una cámara Neubauer. El porcentaje de la reacción acrosomal se efectuó de la forma siguiente:

$$\% \text{ R.A. } = \frac{\text{Número de espermatozoides sin acrosoma}}{\text{Número total de espermatozoides}} \times 100$$

Finalmente, en todos los experimentos las muestras fueron observadas constantemente al microscopio con el fin de determinar la viabilidad de los espermatozoides en los diferentes medios de incubación. La viabilidad se valoró por la calidad de la movilidad de los espermatozoides.

vii) Parámetros estadísticos

En el presente trabajo se utilizaron las pruebas "t" de Student para datos pareados y no-pareados (Sokal y Rohlf, 1980).

E. RESULTADOS

Efecto de la incubación de los espermatozoides en MCM sobre la reacción acrosomal

Los espermatozoides de cuyo incubados en MCM, a una concentración de 35×10^6 células/ml a 37°C , presentaron buena movilidad al inicio de las incubaciones. Durante el transcurso de las mismas, que fue de un lapso de 2 a 4 horas, se observó que los espermatozoides inicialmente en forma de empalizadas, que incluían de 3 - 8 o más espermatozoides, tendían a agruparse en forma de rosetas, es decir, cabeza a cabeza, y luego formaban grandes grumos. Finalmente, se observó un movimiento muy activo en los espermatozoides y una agitación vigorosa del flagelo, en forma semejante a la de un látigo, previo a la ocurrencia de la reacción acrosomal, tal como lo describieron Yanagimachi y Usui (1974).

La viabilidad de los espermatozoides, valorada por su movilidad, fue de hasta 4 horas como máximo. El tiempo de capacitación osciló entre un intervalo de 45 a 75 minutos, medido por la aparición de espermatozoides con reacción acrosomal, (Tabla 3).

Efecto de los inhibidores de la fosfodiesterasa sobre la reacción acrosomal

TABLA 3

TIEMPO DE CAPACITACION OBSERVADO EN PRESENCIA DE LOS
INHIBIDORES DE LA FOSFODIESTERASA

Medio Control (MCM)	MCM más Inhibidores de la Fosfodiesterasa			(n)
	Aminofilina (2.5 mM)	Aminofilina (5 mM)		
I. T.C.: 61.2 ± 3.8	78.0 ± 7.1	84.4 ± 8.0		(8)
	MIX (0.1 mM)	MIX (0.5 mM)		
II. T.C.: 63.3 ± 4.3	65.0 ± 5.4	66.7 ± 5.7		(6)
	Papaverina (2.5 μ M)	Papaverina (5 μ M)	Papaverina (10 μ M)	
III. T.C.: 57.0 ± 7.2	56.7 ± 10.7	56.7 ± 10.7	60.0 ± 7.0	(6)

Los espermatozoides fueron incubados a una concentración de 35×10^6 células/ml a 37°C en MCM como medio control, o en MCM más los inhibidores indicados, a las concentraciones mostradas en la Tabla. Los inhibidores fueron añadidos al inicio de la incubación.

Los valores mostrados corresponden al tiempo de capacitación en minutos \pm E.S.M.

(n) = Número de experimentos

(Teofilina)₂ - etilen - diamina (Aminofilina).

La movilidad, fue mejorada por la presencia de este inhibidor de la PDE pero la viabilidad fue disminuida, a lo largo del período de incubación, con respecto al MCM. Hay que anotar que se observaron muchos núcleos sueltos, cuyo número se incrementó conforme fue mayor la concentración de aminofilina y conforme transcurría el período de la incubación.

El tiempo de capacitación (inicio de la reacción acrosomal), fue mucho más largo, entre mayor fue la concentración del inhibidor, con respecto al control MCM (Tabla 3).

La aminofilina inhibió de manera notable la reacción acrosomal y su efecto fue dependiente de la concentración durante todo el transcurso de la incubación (Figs. 7 y 8). Los resultados, luego de 3 horas de incubación, mostraron un porcentaje de aproximadamente 64% de reacción acrosomal en ausencia de aminofilina, (en MCM), contra menos del 35% ($P < 0.05$) en presencia de 2.5 mM de aminofilina (Fig. 7). Asimismo, se observó menos del 20% de R.A. ($P < 0.05$) cuando se incubaron los espermatozoides en presencia de 5 mM de aminofilina, (Fig. 8). Empero, a la concentración de 10 mM de aminofilina no se observó R.A. en ninguno de los experimentos efectuados.

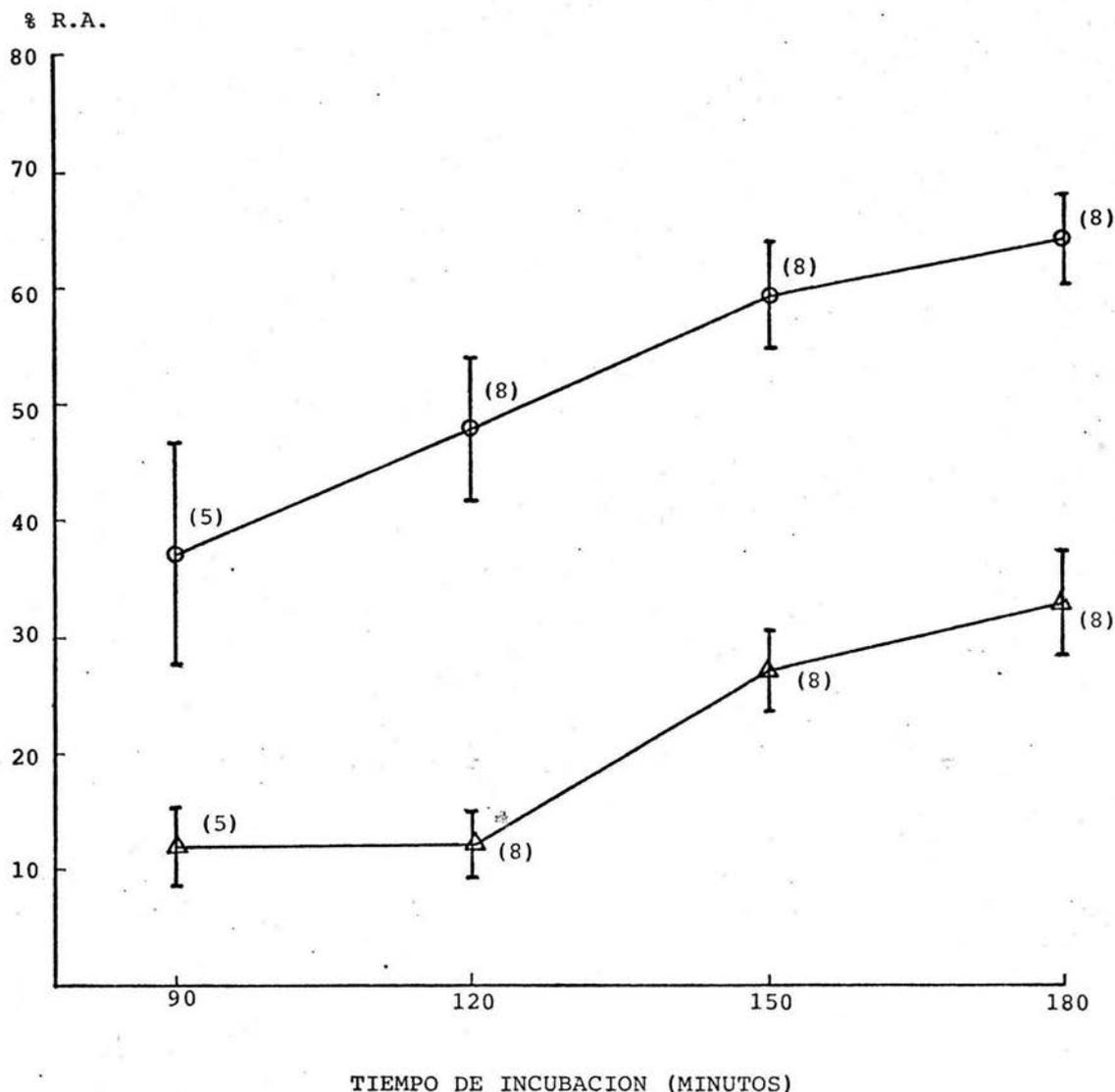


Fig. 7. Efecto de la aminofilina 2.5 mM sobre la reacción acrosomal en espermatozoides de cuyo. Los espermatozoides fueron incubados en MCM (o—o), y en MCM - 2.5 mM aminofilina (Δ — Δ). El inhibidor se añadió al inicio de la incubación. La R.A. se valoró a los tiempos indicados en la abscisa, en muestras fijadas con formaldehído, como se indicó en Métodos. Los porcentajes de R.A. corresponden a los valores promedio del número de experimentos indicados entre paréntesis \pm ESM dado en las barras verticales.

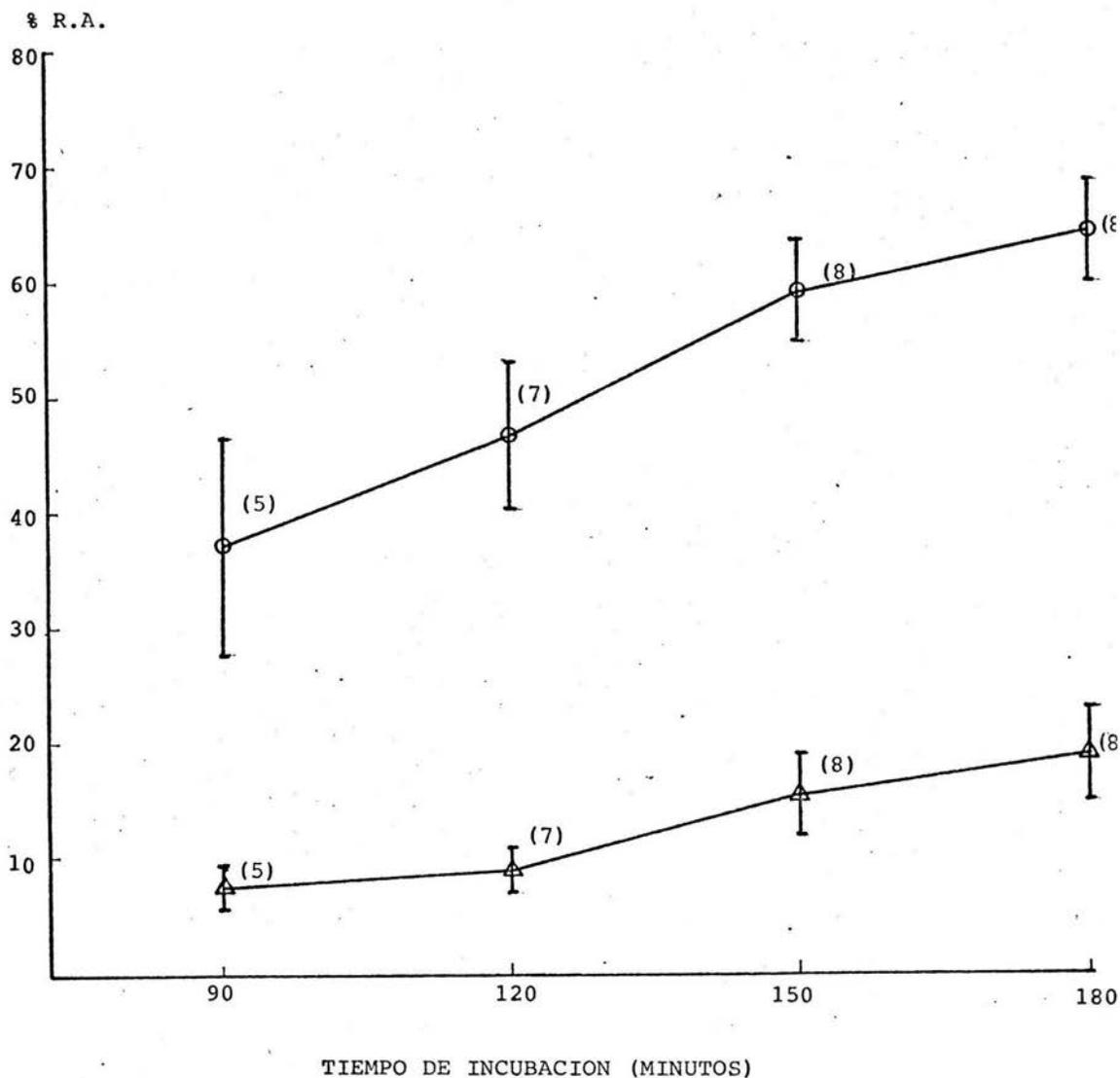


Fig. 8. Efecto de la aminofilina 5mM sobre la reacción acrosomal en espermatozoides de cuyo. Los espermatozoides fueron incubados en MCM (o—o), y en MCM - 5 mM de Aminofilina (Δ — Δ). El inhibidor se añadió al inicio de la incubación. La R.A. se valoró, a los tiempos indicados en la abscisa, en muestras fijadas con formaldehído, como se indica en Métodos. El porcentaje de R.A. corresponden a los valores promedio, del número de experimentos indicados entre paréntesis \pm ESM dado en las barras verticales.

1-Metil-3-isobutilxantina (MIX). El tiempo de capacitación observado en presencia de este inhibidor, a las concentraciones de 0.1 y 0.5 mM, fue similar al observado en el control MCM, (Tabla 3). Igual que con la aminofilina, el movimiento de los espermatozoides fue estimulado y la viabilidad disminuida por la presencia de este inhibidor de la PDE.

Este compuesto también inhibió la reacción acrosomal durante todo el transcurso de la incubación y su efecto inhibitorio fue más notable entre mayor fue la concentración utilizada (Figs. 9 y 10). Los resultados, después de 3 horas de incubación, mostraron que la R.A. fue de aproximadamente 52% en ausencia de MIX contra menos del 40% ($P < 0.05$) en presencia de 0.1 mM de MIX (Fig. 9). Menos de 35% R.A. ($P < 0.05$) se observó cuando se incubaron los espermatozoides en presencia de 0.5 mM de este inhibidor de la PDE (Fig. 10).

6,7-Dimetoxi-1-veratrylisoquinolina (Papaverina). El movimiento de los espermatozoides incubados en MCM mas papaverina, fue más lento que el de los espermatozoides incubados en MCM, al inicio de las incubaciones. Sin embargo, durante el curso de la incubación el movimiento fue mejorando, hasta igualar el de los espermatozoides incubados en MCM para luego declinar de manera notable hasta quedar totalmente inmóviles.

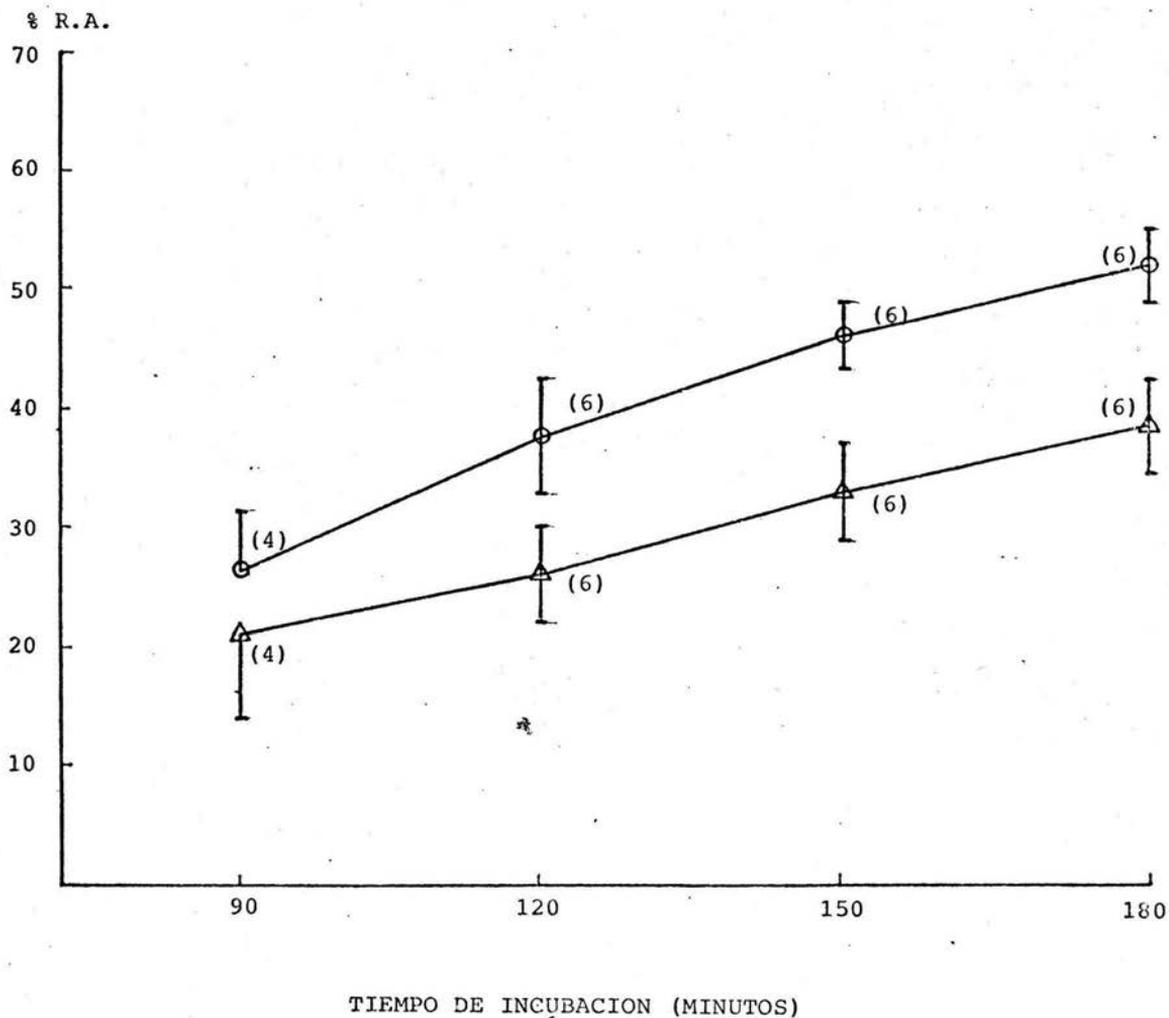


Fig. 9. Efecto de la 1-metil-3-isobutilxantina (MIX-0.1) sobre la reacción acrosomal en espermatozoides de cuyo. Los espermatozoides se incubaron en MCM (o—o), y en MCM - 0.1 mM de MIX (Δ — Δ). El inhibidor se añadió al inicio de la incubación. La reacción acrosomal se valoró a los tiempos indicados, en la abscisa, en muestras fijadas con formaldehído, como se indicó en Métodos. El porcentaje de R.A. corresponde a los valores promedio del número de experimentos indicados entre paréntesis \pm ESM dado en las barras verticales.

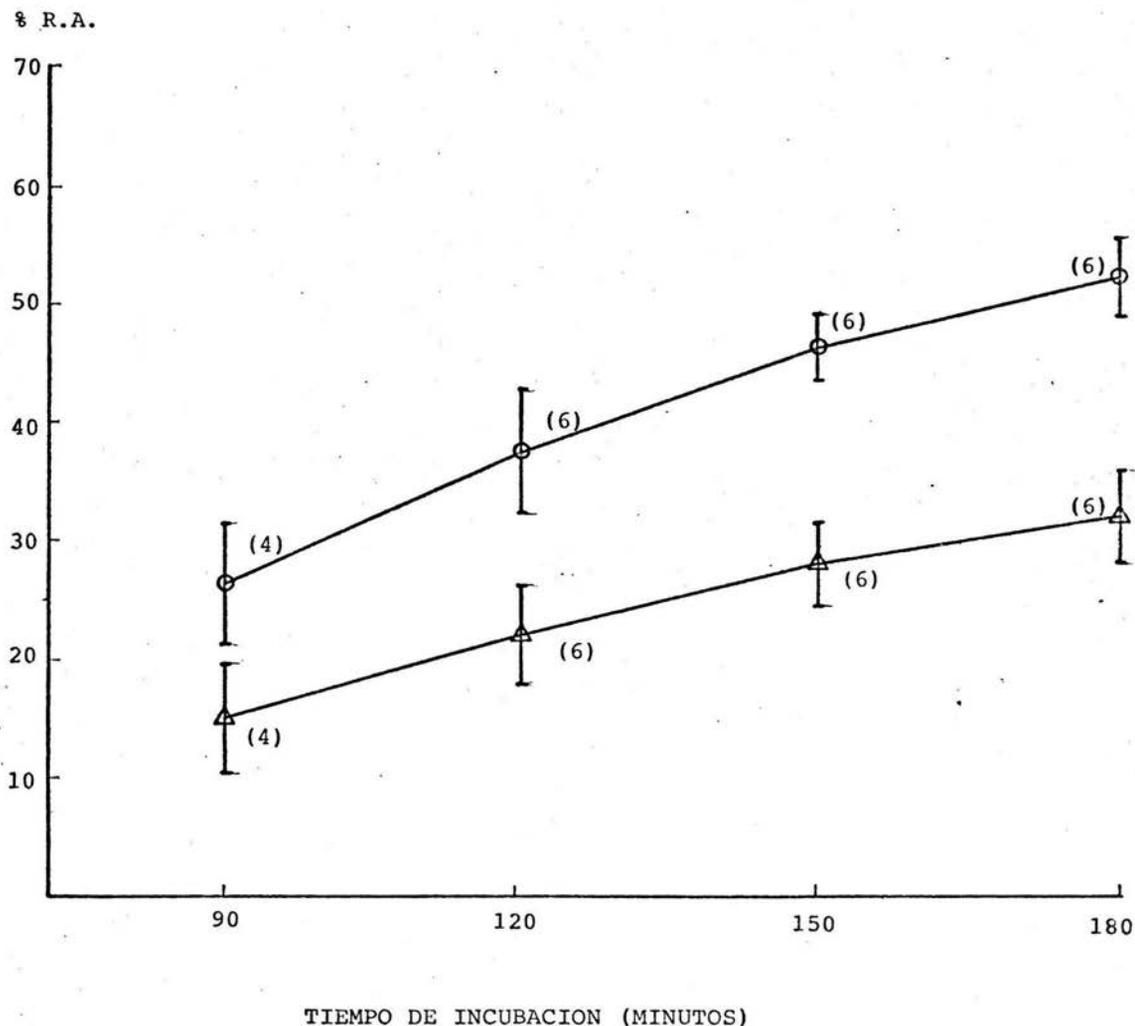


Fig. 10. Efecto de la 1-metil-3-isobutilxantina (MIX-0.5) sobre la reacción acrosomal en espermatozoides de cuyo. Los espermatozoides fueron incubados en MCM (o—o) y en MCM - 0.5 mM de MIX (△—△). El inhibidor se añadió al inicio de la incubación. La R.A. se valoró, a los tiempos indicados en la abscisa, en muestras fijadas con formaldehído, como se indica en Métodos. El porcentaje de R.A. corresponde a los valores promedio del número de experimentos indicados entre paréntesis \pm ESM dado en las barras verticales.

Así, la viabilidad fue de un tiempo máximo de 3 horas, valorada por la movilidad de los espermatozoides. El tiempo de capacitación fue simultáneo para las diferentes concentraciones de papaverina, respecto a los espermatozoides incubados en MCM (Tabla 3).

Este compuesto también inhibió la R.A. a concentraciones mil veces menores que las probadas de MIX o de aminofilina. Su efecto, al igual que el de los otros inhibidores de la PDE, fue más notable entre mayor fue la concentración utilizada en el medio, a cualquier tiempo de la incubación (Figs. 11, 12 y 13). Después de 3 horas de incubación los resultados mostraron aproximadamente un 49% de R.A. en ausencia de papaverina contra menos de 34% de R.A. ($P < 0.05$) en presencia de $2.5 \mu\text{M}$ de papaverina (Fig. 11), mientras que a la concentración de $5 \mu\text{M}$ del inhibidor se obtuvo menos del 26% de R.A. ($P < 0.05$, Fig. 12). Finalmente, a la concentración de $10 \mu\text{M}$ de papaverina el porcentaje de R.A. fue menor del 23% ($P < 0.05$), como se indica en la Fig. 13.

Efecto de concentraciones bajas de dbAMPC durante una preincubación corta sobre la capacitación y la reacción acrosomal

Se procedió a probar este análogo del AMPC, con el

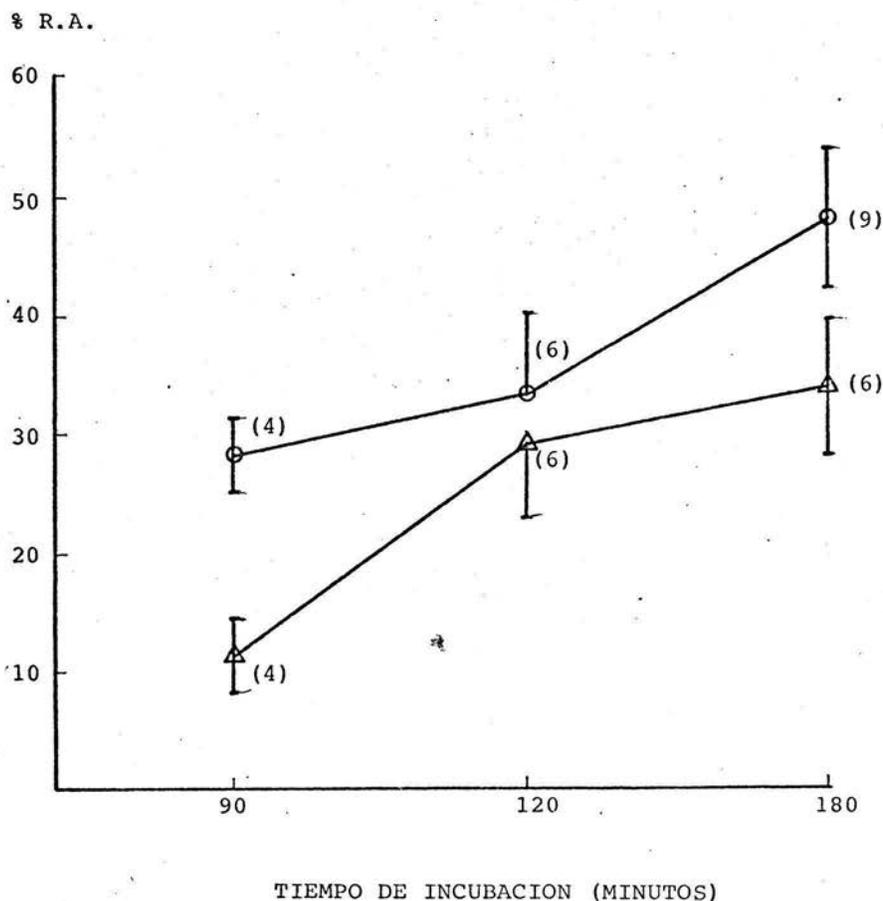


Fig. 11. Efecto de la papaverina 2.5 μ M sobre la reacción acrosomal en espermatozoides de cuyo. Los espermatozoides fueron incubados en MCM (o—o) y en MCM - 2.5 μ M de papaverina (Δ — Δ). El inhibidor se añadió al inicio de la incubación. La R.A. se valoró a los tiempos indicados en la abscisa, en muestras fijadas con formaldehído, como se indica en Métodos. El porcentaje de R.A. corresponde a los valores promedio del número de experimentos indicados entre paréntesis \pm ESM dado en las barras verticales.

% R.A.

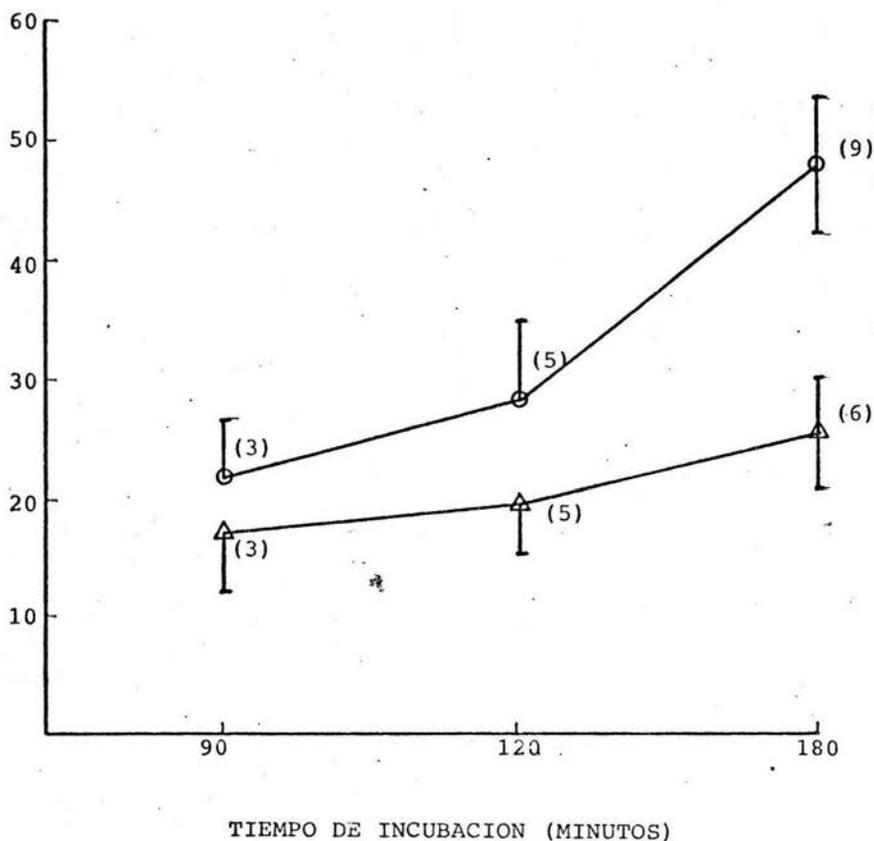


Fig. 12. Efecto de la papaverina 5 μ M sobre la reacción acrosomal en espermatozoides de cuyo. Los espermatozoides fueron incubados en MCM (o—o) y en MCM + 5 μ M de papaverina (Δ — Δ). El inhibidor se añadió al inicio de la incubación. La R.A. se valoró a los tiempos indicados en la abscisa, en muestras fijadas con formaldehído, como se indica en Métodos. El porcentaje de R.A. corresponde a los valores promedio del número de experimentos indicados entre paréntesis \pm ESM dado en las barras verticales.

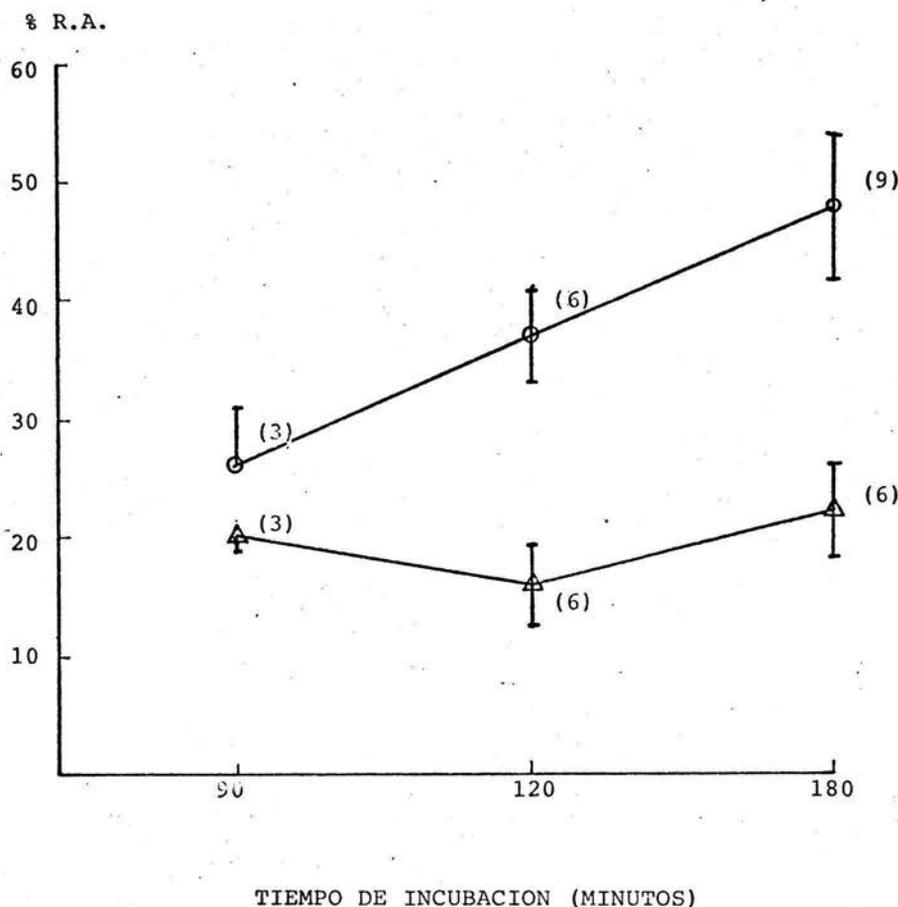


Fig. 13. Efecto de la papaverina 10 μ M sobre la reacci3n acrosomal en espermatozoides de cuyo. Los espermatozoides fueron incubados en MCM (o—o) y en MCM - 10 μ M de papaverina (Δ — Δ). El inhibidor se a1adi3 al inicio de la incubaci3n. La R.A. se valor3 a los tiempos indicados en la abscisa, en muestras fijadas con formaldehido, como se indica en M3todos. El porcentaje de R.A. corresponde a los valores promedio del n3mero de experimentos indicados entre par3ntesis \pm ESM dado en las barras verticales.

objeto de obtener evidencias más convincentes del efecto de este nucleótido sobre la capacitación y la reacción acrosomal.

Los espermatozoides de cuyo fueron incubados en un volumen de 0.1 ml de MCM más dbAMPC, a diferentes concentraciones (28, 56, 84 y 140 μ M) durante un período de 30 segundos, luego del cual se les añadió MCM (0.9 ml) y se mantuvieron así durante un lapso de 5 minutos. Enseguida, se extrajeron muestras alícuotas de 0.5 ml de los diversos medios y se centrifugaron, como se describió en Métodos. A las pastillas se les adicionó MCM (muestras transferidas), mientras que al resto de la muestra de espermatozoides sin centrifugar se le consideró como grupo control. Luego se procedió a determinar la reacción acrosomal, tanto cualitativa como cuantitativamente a partir de la transferencia de los espermatozoides a MCM, (como se indica en Métodos). El inicio de la reacción acrosomal fue simultáneo en todas las muestras transferidas. Lo mismo ocurrió en todas las muestras control (no transferidas). Sin embargo, en los espermatozoides transferidos la R.A. apareció antes que en las correspondientes muestras control (Tabla 4). Así, en las muestras transferidas el tiempo de capacitación fue de aproximadamente de 43 minutos, mientras que en el control fue de 62 minutos,

TABLA 4

EFECTO DE CONCENTRACIONES BAJAS DE dbAMPc DURANTE UNA PREINCUBACION DE 5 MINUTOS, CON DILUCION A LOS 30 SEGUNDOS INICIALES, SOBRE LA CAPACITACION DE LOS ESPERMATOZOIDEOS DE CUYO

Medio de Preincubación	Muestra Control	Muestra Transferida
MCM	61.7 \pm 7.4	43.3 \pm 4.5
MCM + dbAMPc (28 μ M)	61.7 \pm 7.4	43.3 \pm 4.5
MCM + dbAMPc (56 μ M)	61.7 \pm 7.4	43.3 \pm 4.5
MCM + dbAMPc (84 μ M)	61.7 \pm 7.4	43.3 \pm 4.5
MCM + dbAMPc (140 μ M)	61.7 \pm 7.4	43.3 \pm 4.5

Los espermatozoides fueron preincubados a 37°C en MCM y en MCM + dbAMPc a las concentraciones indicadas, 30 segundos después se les adicionó MCM (dilución 1:10) y se mantuvieron así durante 5 minutos. Se tomaron muestras alicuotas de 0.5 ml para centrifugarlas y a las pastillas se les agregó un volumen de MCM similar al del sobrenadante desechado (muestras transferidas). A las muestras sin centrifugar se les denominó muestras control. Los valores mostrados corresponden al tiempo de capacitación, en minutos \pm E.S.M., contado a partir de la transferencia. Los valores corresponden al promedio de tres experimentos.

aproximadamente.

El porcentaje de R.A. después de 2 horas de incubación fue mayor en las muestras transferidas, 45% aproximadamente, con respecto a sus correspondientes muestras control, donde se observó un 35% de R.A. aproximadamente, (Tabla 5, Fig. 14).

La movilidad fue notablemente estimulada por este análogo del AMPc, pero la viabilidad, valorada por la movilidad de los espermatozoides, no fue mayor de 2 1/2 horas, mientras que en los controles siempre fue mayor de 3 horas.

Efecto de concentraciones altas de dbAMPc sobre la capacitación y la reacción acrosomal

En esta serie de experimentos, los espermatozoides fueron incubados en MCM más dbAMPc a concentraciones de 1 y de 5 mM, durante un período de 5 minutos. En seguida, se extrajeron muestras alícuotas de 0.5 ml de cada una de los medios y se centrifugaron. A las pastillas se les adicionó MCM, (muestras transferidas), mientras que el resto de las muestras de espermatozoides sin centrifugar se les mantuvo como grupo control. El tiempo de capacitación fue simultáneo en las muestras control, a los 60 minutos de incubación aproximadamente. Lo mismo ocurrió en las muestras transferidas, en las que se observó un tiempo aproximado de 45 minutos. Es

TABLA 5

EFFECTO DE CONCENTRACIONES BAJAS DE dbAMPc DURANTE UNA PREINCUBACION DE 5 MINUTOS, CON DILUCION, A LOS 30 SEGUNDOS INICIALES, SOBRE LA REACCION ACROSOMAL EN ESPERMATOZOIDES DE CUYO

Medio de Preincubación	% de Reacción Acrosomal \pm E.S.M.	
	Muestra Control	Muestra Transferida
MCM	39.7 \pm 8.5	44.0 \pm 1.6
MCM + dbAMPc (28 μ M)	35.0 \pm 4.8	50.3 \pm 10.7
MCM + dbAMPc (56 μ M)	38.0 \pm 6.1	43.3 \pm 8.3
MCM + dbAMPc (84 μ M)	29.5 \pm 2.9	40.5 \pm 6.5
MCM + dbAMPc (140 μ M)	40.1 \pm 8.4	43.3 \pm 12.0

Los espermatozoides fueron preincubados a 37°C en MCM y en MCM + dbAMPc a las concentraciones indicadas, 30 segundos después se les adicionó MCM (dilución 1:10) y se mantuvieron así durante 5 minutos. Se tomaron muestras alícuotas de 0.5 ml para centrifugarlas y a las pastillas se les agregó un volumen de MCM similar al del sobrenadante desechado (muestras transferidas). A las muestras sin centrifugar se les denominó muestras control. Los valores mostrados del % de reacción acrosomal fueron determinados en muestras alícuotas fijadas a las 2 horas de incubación contadas a partir de la transferencia de los espermatozoides. Los valores corresponden al promedio de tres experimentos.

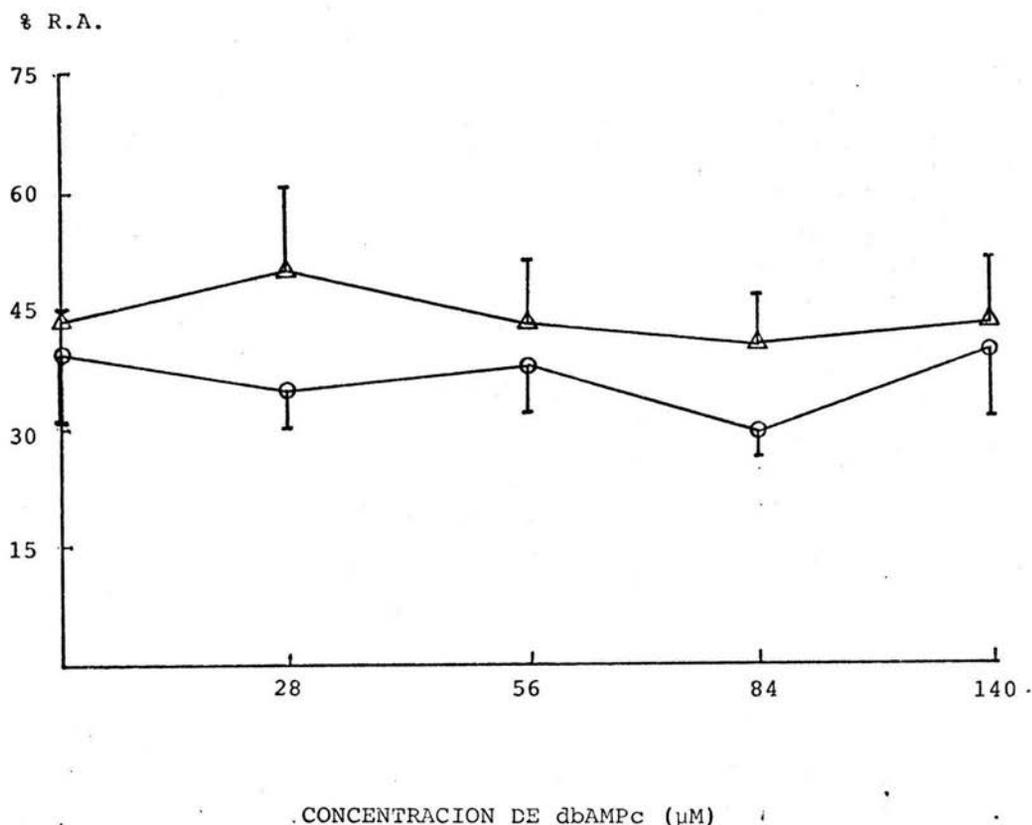


Fig. 14. Efecto de concentraciones bajas de dbAMPc, durante una preincubación corta, sobre la reacción acrosomal en espermatozoides de cuyo. Los espermatozoides se preincubaron a 37°C en MCM y en MCM + dbAMPc, a las concentraciones indicadas. 30 Segundos después, se les adicionó MCM (dilución 1:10) y se mantuvieron así durante 5 minutos. Se tomaron muestras alícuotas para centrifugarlas y a las pastillas se les agregó un volumen de MCM similar al del sobrenadante desechado (muestras transferidas, Δ — Δ). A las muestras sin centrifugar se les denominó muestras control (o—o). Los valores corresponden al promedio de 3 experimentos \pm ESM.

decir, en las muestras transferidas el inicio de la reacción acrosomal apareció antes que en sus correspondientes muestras control (Tabla 6).

Los resultados, luego de 15 minutos del inicio de la reacción acrosomal, mostraron un efecto inhibitorio sobre la R.A., dependiente de la concentración de dbAMPc. Este efecto se observó tanto en el grupo control como en las muestras transferidas (Tabla 7).

Por otra parte, se observó que el movimiento de los espermatozoides fue estimulado por la presencia de este nucleótido en el medio de incubación. Sin embargo, la viabilidad no fue mayor de 2 1/2 horas en presencia del nucleótido, mientras que en los MCM control y transferido fue siempre mayor de 3 horas.

Valoración de la reacción acrosomal en espermatozoides preincubados en MCM y transferidos a MCM mas dbAMPc

Con el objeto de observar si el incremento de los niveles de AMPc pudiera estimular la expresión de la reacción acrosomal en espermatozoides capacitados, se añadió dbAMPc a concentraciones variables (28 μ M, 1 y 5 mM) al medio de transferencia MCM. De los datos obtenidos en nuestro laboratorio, sabemos que generalmente una preincubación de 5 minutos en MCM no permite la ocurrencia de la reacción acrosomal en espermatozoides transferidos a MCM. En base a ésto, nosotros quisimos

TABLA 6

EFEECTO DE CONCENTRACIONES ALTAS DE dbAMPc DURANTE UNA PREINCUBACION DE 5 MINUTOS SOBRE LA CAPACITACION DE LOS ESPERMATOZOIDES DE CUYO

Medio de Preincubación	Muestra Control	Muestra Transferida
MCM	61.7 \pm 7.4	43.3 \pm 4.5
MCM + dbAMPc (1 mM)	60.0 \pm 2.9	50.0 \pm 5.9
MCM + dbAMPc (5 mM)	58.3 \pm 1.7	40.0 \pm 5.9

Los espermatozoides fueron preincubados a 37°C, en MCM y en MCM más dbAMPc a las concentraciones indicadas, durante un período de 5 minutos. Se tomaron muestras alícuotas de 0.5 ml para centrifugarlas y a las pastillas se les agregó un volumen de MCM similar al del sobrenadante desechado (muestras transferidas). Las muestras sin centrifugar fueron las muestras control.

Los valores mostrados corresponden al tiempo de capacitación en minutos \pm E.S.M., contado a partir de la transferencia.

Los valores corresponden al promedio de tres experimentos.

TABLA 7

EFFECTO DE CONCENTRACIONES ALTAS DE dbAMPc
DURANTE UNA PREINCUBACION DE 5 MINUTOS SOBRE LA
R.A. EN ESPERMATOZOIDEOS DE CUYO

Medio de Preincubación	% de Reacción Acrosomal \pm E.S.M.	
	Muestra Control	Muestra Transferida
MCM	27.3 \pm 3.0	24.0 \pm 5.2
MCM + dbAMPc (1 mM)	21.0 \pm 1.6	21.7 \pm 5.1
MCM + dbAMPc (5 mM)	15.0 \pm 2.7	14.7 \pm 1.7

Los espermatozoides fueron preincubados a 37°C, en MCM y en MCM más dbAMPc a las concentraciones indicadas, durante un período de 5 minutos. Se tomaron muestras alícuotas de 0.5 ml para centrifugarlas y a las pastillas se les agregó un volumen de MCM similar al del sobrenadante desechado (muestras transferidas). Las muestras sin centrifugar fueron las muestras control.

Los valores mostrados del % de reacción acrosomal son de muestras alícuotas fijadas 15 minutos después de la aparición de espermatozoides con reacción acrosomal.

Los valores corresponden al promedio de tres experimentos.

probar si la presencia de dbAMPc en el medio de transferencia podría permitir la expresión de la reacción acrosomal. Así, los espermatozoides fueron preincubados durante un lapso de 5 minutos en MCM, luego del cual se tomaron muestras alícuotas para centrifugarlas. Las pastillas se resuspendieron en MCM o en MCM más dbAMPc en el mismo volumen que el sobrenadante desechado. Además, se mantuvo una muestra en MCM sin transferir.

La movilidad de los espermatozoides transferidos a MCM más dbAMPc fue más estimulada entre mayor fue la concentración de dbAMPc en el medio, con respecto a los mantenidos en MCM o los transferidos a MCM. La viabilidad, valorada por la movilidad, no fue mayor de 2 1/2 horas en los espermatozoides transferidos a MCM más dbAMPc, mientras que en los MCM fue mayor de 3 horas.

El tiempo de capacitación de los espermatozoides transferidos a MCM o a MCM - dbAMPc fue similar (aproximadamente 40 minutos), mientras que en el MCM sin transferir fue de aproximadamente de 60 minutos (Tabla 8). Por otra parte, luego de 2 horas de incubación se obtuvo un porcentaje de aproximadamente 42% de R.A. para la muestra transferida a MCM así como para las transferidas a MCM mas dbAMPc, a concentraciones variables, mientras que en la muestra sin transferir se observó un 33% de R.A. (Tabla 8).

TABLA 8

TIEMPO DE CAPACITACION Y PORCENTAJE DE R.A. EN ESPERMATOZOIDES
DE CUYO, PREINCUBADOS 5 MINUTOS EN MCM
Y TRANSFERIDOS A MCM MAS dbAMPc

Medio de Preincubación (Control)	Medio de Transferencia	Tiempo de Capacitación (Minutos \pm E.S.M.)	% R.A. \pm E.S.M.
MCM	Sin Transferir	61.6 \pm 1.7	33.0 \pm 4.7
MCM	MCM	36.7 \pm 6.1	44.3 \pm 7.3
MCM	MCM + dbAMPc (28 μ M)	40.0 \pm 8.8	40.7 \pm 4.9
MCM	MCM + dbAMPc (1 mM)	36.7 \pm 6.1	45.0 \pm 2.1
MCM	MCM + dbAMPc (5 mM)	36.7 \pm 6.1	43.7 \pm 4.7

Los espermatozoides fueron preincubados a 37°C en MCM, durante un lapso de 5 minutos. Luego se tomaron muestras alícuotas para centrifugarlas y a las pastillas se les adicionó MCM o MCM más dbAMPc, a las concentraciones indicadas en la tabla, en un volumen igual al del sobrenadante desechado (medio de transferencia). El medio de preincubación sin centrifugar funcionó como grupo control. Los valores mostrados del tiempo de capacitación corresponden a los minutos transcurridos desde la transferencia hasta el inicio de la reacción acrosomal. El % de reacción acrosomal se valoró en muestras alícuotas fijadas a las 2 horas de incubación contadas a partir de la transferencia.

Los valores corresponden al promedio de tres experimentos.

F. D I S C U S I O N

El propósito del presente trabajo fue el de determinar la relación existente entre los niveles intracelulares elevados de AMPc, respecto a la capacitación y la reacción acrosomal en espermatozoides de cuyo. El medio de incubación que utilizamos en nuestros experimentos permite que los espermatozoides se capaciten y presenten reacción acrosomal fisiológica (Yanagimachi y Usui, 1974; Rogers y Yanagimachi, 1975b). Puesto que las metilxantinas, tales como la aminofilina y la MIX, además de la papaverina, pueden provocar una elevación intracelular de AMPc, por medio de la inhibición de la fosfodiesterasa, nosotros utilizamos estos compuestos para determinar, de manera indirecta, el papel del AMPc durante los procesos de la capacitación y de la reacción acrosomal. Sin embargo, para valorar de manera más directa la influencia del AMPc sobre estos parámetros, los espermatozoides fueron incubados en presencia de un análogo de este nucleótido, el dibutiril-AMPc.

Los efectos de los nucleótidos cíclicos exógenos pueden verse complicados por su bajo grado de permeabilidad hacia el interior de la célula, o bien, por su rápida hidrólisis por parte de la fosfodiesterasa.

Sin embargo, se ha demostrado que el dbAMPc es más efectivo que el AMPc, en estudios *in vitro*, debido a que es más resistente a la hidrólisis por parte de la fosfodiesterasa y, además, a su solubilidad en lípidos, lo cual lo hace más permeable a las membranas celulares.

Se han comunicado resultados que sugieren que la elevación del AMPc intracelular, por medio de la incubación de los espermatozoides con inhibidores de la PDE o con análogos del AMPc, estimula la movilidad y la capacitación de estas células, *in vitro* (Hoskins y Casillas, 1975b).

Hyne y Garbers (1979a) obtuvieron resultados en los que se observa una correlación entre los niveles endógenos elevados de AMPc, inducidos por MIX y calcio, y la ocurrencia de la reacción acrosomal en espermatozoides de cuyo, capacitados *in vitro*. Ellos sugirieron que la elevación intracelular de AMP no provocaba, por sí misma, la reacción acrosomal. Estos autores se apoyaron en la observación de que, no obstante un notable incremento en el nivel intracelular de AMPc, dentro de los primeros 30 segundos de incubación de los espermatozoides, en diferentes medios, la reacción acrosomal no ocurrió a menos que los gametos estuvieran previamente capacitados, mediante una incubación en MCM o en MCM añadido de 8-Br-AMPc o MIX. En estas condiciones,

la reacción acrosomal, acompañada de una segunda elevación de AMPc intracelular, se presentó en respuesta a la adición de calcio al medio. Además, se observó que el 8-Br-AMPc y la MIX disminuyeron el tiempo de capacitación, ya que la aparición de la reacción acrosomal, en respuesta a la adición de calcio a los medios de incubación, conteniendo estos compuestos, fue mucho más temprana. Así, estos autores sugirieron que la reacción acrosomal estaba asociada con un transporte primario de calcio y con un incremento, dependiente del mismo, en la concentración intracelular de AMPc.

Sin embargo, Rogers y García (1979) comunicaron que la incubación de los espermatozoides de cuyo, durante un lapso de 4 horas en un medio capacitante (MCM), semejante al utilizado por Hyne y Garbers (1979a) y por nosotros también, conteniendo dbAMPc o inhibidores de la PDE (cafeína, MIX o teofilina) a concentraciones de 1 a 10 mM, provocaba la inhibición de la reacción acrosomal. El efecto inhibitorio de estos compuestos fue más notable entre mayor fue la concentración de los mismos. Así, estos autores sugirieron que, en la capacitación y en la reacción acrosomal podría estar involucrada una disminución en el nivel intracelular de AMPc.

En el presente estudio, se observó que la movilidad de los espermatozoides fue estimulada por el dbAMPC, así como por los inhibidores de la PDE probados, (aminofilina, MIX y papaverina), lo que concuerda con otros trabajos anteriores (Turner y Giles, 1982; Gorus et al., 1982; Hoskins y Casillas, 1975b). Sin embargo, en nuestros experimentos la viabilidad de los espermatozoides, tratados con los compuestos mencionados, fue siempre menor de 2½ horas, mientras que en MCM fue siempre mayor de 3 horas. Estos resultados difieren de los obtenidos por Rogers y García (1979), ya que ellos observaron una viabilidad mayor de 4 horas, en los espermatozoides de cuyo incubados en MCM o bien, en MCM mas los inhibidores de la PDE. Es posible que esta discrepancia se deba a una diferencia en los procedimientos de experimentación.

En el presente estudio, se observó que el tiempo de capacitación de los espermatozoides no se alteró por la incubación de los mismos en presencia de dbAMPC, papaverina o MIX. Sin embargo, en presencia de aminofilina, el tiempo de capacitación se retrasó respecto al observado en el control, y este retraso fue directamente proporcional a la concentración de aminofilina en el medio de incubación (Tabla 3). Contrariamente a estos resultados, Hyne y Garbers (1979a) observaron una

disminución en el tiempo de capacitación de los espermatozoides de cuyo, incubados en presencia de 8-Br-AMPC o de MIX. Quizá esta discrepancia se deba a los distintos análogos del AMPC utilizados por estos autores y por nosotros. Se sabe que los análogos de este nucleótido cíclico difieren en su grado de permeabilidad hacia el interior de la célula, y en su resistencia a la hidrólisis por parte de la fosfodiesterasa. También, es posible atribuir la diferencia a que, en nuestras condiciones de incubación, el calcio fue añadido desde el inicio de la misma y es improbable que, en estas condiciones, haya ocurrido una segunda elevación intracelular drástica de AMPC que, según estos autores, ocurre con la adición de calcio al medio, después de un cierto tiempo de incubación de los espermatozoides. Esta segunda elevación de AMPC interno provocaría, a su vez, la reacción acrosomal. Por otra parte, Fraser (1981) observó también una disminución en el tiempo de capacitación de los espermatozoides de ratón, incubados en presencia de dbAMPC o de cafeína, pero en este caso, es posible que la discrepancia se deba a la diferencia entre las especies con las que se experimentó.

No obstante las discrepancias entre los resultados obtenidos por los autores arriba mencionados, y los obtenidos por nosotros, no se debe descartar la teoría

según la cual, el AMPc desempeña un papel modulador, secundario, durante el proceso de la capacitación (Perrault y Rogers, 1982). En nuestros experimentos nosotros observamos que, cuando los espermatozoides fueron preincubados durante un lapso de 5 minutos en MCM y, posteriormente, transferidos a MCM mas dbAMPc, a diferentes concentraciones (28 μ M, 1 mM y 5 mM), no se obtuvo ninguna diferencia en el porcentaje de R.A., respecto al control, después de 2 horas de incubación, a partir de la transferencia (Tabla 8). Asimismo, cuando los gametos fueron preincubados, durante 30 segundos, en MCM mas diferentes concentraciones de dbAMPc, (28, 56, 84 y 140 μ M), y diluidos, y finalmente transferidos a MCM, tampoco se observó ninguna diferencia en el porcentaje de R.A. después de 2 horas de incubación, respecto al control (Tabla 5, Fig. 14). Finalmente, cuando los espermatozoides fueron preincubados en MCM mas dbAMPc (1 y 5 mM), durante un lapso de 5 minutos, y luego transferidos a MCM, se observó que la inhibición de la R.A., después de 15 minutos del inicio de la misma, fue dependiente de la dosis del nucleótido. Es decir, hubo un menor porcentaje de R.A. entre mayor fue la concentración de dbAMPc en el medio de preincubación (Tabla 6). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Rogers y García (1979) respecto a

la inhibición de la R.A., de los espermatozoides de cuyo, en presencia de dbAMPC.

En el presente estudio, nuestros resultados mostraron que los inhibidores de la PDE, así como también el dbAMPC, presentes en el medio desde el inicio de la incubación, inhibieron la R.A. desde el inicio de la misma hasta el final de la incubación, en los espermatozoides de cuyo, bajo condiciones de capacitación *in vitro*. De esta manera, se puede sugerir que los niveles intracelulares elevados de AMPC, ejercen un efecto inhibitorio sobre la reacción acrosomal, que pudiera ser el resultado de una inhibición de la capacitación, en espermatozoides de cuyo, ya que los inhibidores de la PDE incrementaron, teóricamente, el nivel intracelular de AMPC, mientras que el dbAMPC pudo contribuir de una forma más directa a la elevación intracelular de AMPC.

Rogers y García (1979) sugirieron que los niveles altos de AMPC intracelular pueden inhibir la capacitación o la reacción acrosomal, mediante la estimulación de algún tipo de metabolismo anaeróbico. Esto es apoyado por el hecho de que los azúcares glicolizables aumentan el tiempo de incubación necesario para la aparición de la R.A., en espermatozoides de cuyo (Rogers y Yanagimachi, 1975b), y por las evidencias de que el AMPC activa una

fosfofructocinasa, la cual está involucrada en el control de la glucólisis en los espermatozoides de primate (Hoskins et al., 1971). De los resultados obtenidos por nosotros, se puede sugerir que, durante la capacitación de los espermatozoides de cuyo, las altas concentraciones intracelulares de AMPc, en presencia de calcio desde el inicio de la incubación, son perjudiciales para estas células. La preincubación, durante 5 minutos, de los espermatozoides en presencia de altas concentraciones de dbAMPc, probablemente elevó el nivel intracelular de AMPc. Sin embargo, la ausencia de R.A. dentro de los primeros 15 minutos después de la transferencia de los gametos a MCM, indica que los 5 minutos de preincubación, en las condiciones de ensayo señaladas, no fueron suficientes para capacitar a estas células. Esto es apoyado por el hecho de que los espermatozoides transferidos a MCM, después de la preincubación de los mismos, en MCM mas dbAMPc, mostraron inhibición de la R.A. a las 2 horas después de la transferencia, con respecto al control. Fraser (1981) ha sugerido que el AMPc intracelular requiere de cierto tiempo y/o de cierta concentración umbral, para tener algún efecto sobre la reacción acrosomal.

Nosotros consideramos que deberían efectuarse estudios sobre el contenido de AMPc intraespermático, durante la capacitación *in vitro*, en presencia de inhibidores de la

PDE, con y sin calcio en el medio de incubación. Tales estudios podrían establecer si el AMPc está involucrado directamente en la inhibición de la reacción acrosomal, observada en el presente estudio, y si esta inhibición fue debida a un efecto negativo del AMPc sobre la capacitación, o bien, a un efecto directo sobre la reacción acrosomal.

G. CONCLUSIONES

De los resultados y observaciones obtenidos en el presente estudio, mediante la utilización de un análogo del AMPc, el dibutiril-AMPc, y de los inhibidores de la PDE, la papaverina, la MIX y la aminofilina, se puede concluir lo siguiente:

1. El AMPc estimula la movilidad de los espermatozoides de cuyo.
2. La viabilidad de estas células es disminuida por la presencia de este nucleótido.
3. El AMPc inhibe la reacción acrosomal en los espermatozoides de la especie estudiada.
4. El AMPc, a concentraciones elevadas, no provoca la reacción acrosomal en espermatozoides no-capacitados.
5. La elevación inicial, drástica, de AMPc, durante un tiempo breve (5 minutos), no alteró el tiempo de capacitación, pero sí provocó, posteriormente, una disminución en el número de espermatozoides con reacción acrosomal.

H. B I B L I O G R A F I A

- Austin, C.R. (1951). Observation on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust. J. Sci. Res. B.* 4: 581-596.
- Austin, C.R. (1952). The "capacitation" of the mammalian sperm. *Nature* 170: 326.
- Bavister, B.D. (1980a). World conference on instrumental insemination *in vitro* fertilization and embryo transfer. Hafez, E.S.E. Eds., Kiel, Germany.
- Bavister, B.D. (1980b). Recent progress in the study of early events in mammalian fertilization. *Develop. Growth and Differ.* 22: 385-402.
- Bedford, J.M. (1970). Sperm capacitation and fertilization in mammals. *Biol. Repr. Suppl.* 2: 128-158.
- 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.
- Braun, T. (1975). The effect of divalent cations on bovine spermatozoal adenylate cyclase activity. *J. Cycl. Nucl. Res.* 1: 271-281.
- Cascieri, M., Amann, R.P. and Hammerstedt, R.H. (1976). Adenine nucleotide changes at initiation of bull sperm motility. *J. Biol. Chem.* 251: 787-793.
- Chang, M.C. (1951). Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 168: 697-698.
- Chang, M.C. and Hunter, R.H.F. (1975). Capacitation of mammalian sperm: biological and experimental aspects. In: *Handbook of Physiology*. Hamilton, D.W. and Greep, R.O. Eds. Male Reproductive System. *Am. Physiol. Soc. Sec. 7*, Vol. 7, pp. 339-351.
- Fraser, L.R. (1981). Dibutyryl cyclic AMP decreases capacitation time *in vitro* in mouse spermatozoa. *J. Repr. Fert.* 62: 63-72.
- Fraser, L.R. and Quinn, P.J. (1981). A glycolytic product is obligatory for inhibition of the sperm acrosome reaction and whiplash motility required for fertilization in the mouse. *J. Repr. Fert.* 61: 25-35.

- 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.
- Garbers, D.L. and Kopf, G.S. (1980). The regulation of spermatozoa by calcium and cyclic nucleotides. In: *Adv. Cycl. Nucl. Res.* 13: 251-307. Greengard, P. and Robison, G.A. Eds., N.Y., U.S.A.
- 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. *Biochemistry* 10: 1825-1831.
- Garbers, D.L., Tubb, D.J. and Hyne, R.V. (1982). A requirement of bicarbonate for Ca²⁺-induced elevations of cyclic AMP in guinea pig spermatozoa. *J. Biol. Chem.* 257: 8980-8984.
- Gorus, F.K., Finsky, R. and Pipellers, D.G. (1982). Effect of temperature, nutrients, calcium and cAMP on motility of human spermatozoa. *Am. J. Physiol. (Cell Physiol. II)*: C 304-C 311.
- Green, D.P.L. (1978). The mechanism of the acrosome reaction. In: *Development in mammals*. Johnson, M.H. Eds. North Holland Pub. Co., Vol. 3, 65-81.
- Gwatkin, R.B.L. (1976). Fertilization. In: *The cell surface in animal embryogenesis and development*. Poste, G. and Nicolson, G.L. Eds. Elsevier - North Holland, Amsterdam. 1-54.
- Hicks, J.J., Martínez-Manautou, J., Pedrón, N. and Rosado, A. (1972a). Metabolic changes in human spermatozoa related to capacitation. *Fert. Steril.* 23: 172-179.
- Hicks, J.J., Pedrón, N. and Rosado, A. (1972b). Modifications of human spermatozoa glycolysis by cyclic adenosine monophosphate (cAMP), estrogens, and follicular fluid. *Fert. Steril.* 23: 886-893.
- Hoskins, D.D. (1973). Adenine nucleotide mediation of fructolysis and motility in bovine epididymal spermatozoa. *J. Biol. Repr.* 248: 1135-1140.

- Hoskins, D.D. and Casillas, E.R. (1975a). Function of cyclic nucleotides in mammalian spermatozoa. In: Handbook of Physiology. Vol. V. Greep, R.O. and Astwood, R.O. Eds. Am. Physiol. Soc., Washington, D.C. pp 453-460.
- Hoskins, D.D. and Casillas, E.R. (1975b). Hormones, second messengers, and the mammalian spermatozoa. In: Advances in Sex Hormone Research. Vol. 1. Singhal, R.H. and Thomas, J.A. Eds. University Park Press. Baltimore, Md. pp. 283-321.
- Hoskins, D.D., Stephens, D.T. and Casillas, E.R. (1971). Enzymic control of fructolysis in primate spermatozoa. Biochim. Biophys. Acta. 237: 227-238.
- Huacuja, L., Delgado, N.M., Merchant, H., Pancardo, R. and Rosado, A. (1977). Cyclic AMP induced incorporation on Pi into human spermatozoa membrane components. Biol. Repr. 17: 89-96.
- Hyne, R.V. and Garbers, D.L. (1979a). Calcium-dependent increase in cAMP and induction of the acrosome reaction in guinea pig spermatozoa. Proc. Natl. Acad. Sci. 76: 5699-5703.
- Hyne, R.V. and Garbers, D.L. (1979b). Regulation of guinea pig adenylate cyclase by calcium. Biol. Repr. 21: 1135-1142.
- Hyne, R.V. and Garbers, D.L. (1981). Requirement of serum factors for capacitation and the acrosome reaction of guinea pig spermatozoa in buffered medium below pH 7.8. Biol. Repr. 24: 257-266.
- Li, T.K. (1972). Stimulation of endogenous respiration of ejaculated ram sperm by dbcAMP. Life Sci. II: 939-948.
- Lindemann, Ch.B. (1978). A cAMP-induced increased in the motility of demembrated bull sperm models. Cell 13: 9-18.
- Makman, R.S. and Sutherland, E.W. (1965). Adenosine 3',5'-phosphate in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 240: 1309-1314.
- Mann, T. and Lutwak-Mann, C. (1981). Male reproductive function and semen. Springer-Verlag, Great Britain.

- Meizel, S. (1978). The mammalian sperm acrosome reaction. A biochemical approach. In: Development in mammals. Johnson, M.H. Eds. North Holland Pub. Co. Vol. 3, pp. 1-64.
- Morton, B. and Albagli, L. (1973). Modification of hamster sperm adenyl cyclase by capacitation *in vitro*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 50: 697-703.
- Oliphant, G. and Brackett, B.G. (1973). Capacitation of mouse spermatozoa in media with elevated ionic strength and reversible decapacitation with epididymal extract. Fert. Steril. 24: 948-955.
- O'Rand, M.G. (1972). *In vitro* fertilization and capacitation like-interaction in the hydroid *C. flexuosa*. J. Exp. Zool. 182: 299-306.
- O'Rand, M.G. (1982). Modification of the sperm membrane during capacitation. The cell biology of the testis. Ann. N.Y. Acad. Sci. 383: 392-404.
- O'Rand, M.G. (1977). Restriction of a sperm surface antigen's mobility during capacitation. Develop. Biol. 55: 260-270.
- Pastan, I. (1972). Cyclic AMP. Sci. Am. 227: 97-105.
- Perrault, S.D. and Rogers, E.J. (1982). Relationship between fertilizing ability and cAMP, in human spermatozoa. J. Andrology 3: 396-401.
- Reyes, A., Goicoechea, B. and Rosado, A. (1978). Calcium ion requirement for rabbit spermatozoal capacitation and enhancement of fertilizing ability by ionophore A-23187 and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. Fert. Steril. 29: 451-455.
- Rogers, B.J. and García, L. (1979). Effect of cAMP on acrosome reaction and fertilization. Biol. Repr. 21: 365-372.
- Rogers, B.J. and Yanagimachi, R. (1975a). Release of hyaluronidase from guinea pig spermatozoa through an acrosome reaction initiated by calcium. J. Repr. Fert. 44: 135-138.
- Rogers, B.J. and Yanagimachi, R. (1975b). Retardation of guinea pig sperm acrosome reaction by glucose: the possible importance of pyruvate and lactate metabolism in capacitation and the acrosome reaction. Biol. Repr. 13: 568-575.

- Santos-Sacchi, J. and Gordon, M. (1980). Induction of the acrosome reaction in guinea pig spermatozoa by cGMP analogues. *J. Cell Biol.* 85: 798-803.
- Singhal, R.L. and Sutherland, D.J.B. (1975). Cyclic 3',5'-adenosine monophosphate and accessory sex organ responses. In: *Advances in Sex Hormone Research*. Singhal, R.H. and Thomas, J.A. Eds. Baltimore, Md. Vol. 1, pp. 225-282.
- Sokal, R.R. and Rohlf, F.J. (1980). *Introducción a la bioestadística*. Edit. Reverté.
- Stephens, D.T., Wang, J.L. and Hoskins, D.D. (1979). The cyclic AMP phosphodiesterase of bovine spermatozoa: multiple forms, kinetic properties, and changes during development. *Biol. Repr.* 20: 483-491.
- 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.
- Yanagimachi, R. (1977). Specificity of sperm-egg interaction. In: *Immunobiology of gametes*. Edidin, M. and Johnson, M.H. Eds. Cambridge. pp. 255-289.
- Yanagimachi, R. and Usui, N. (1974). Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. *Exp. Cell Res.* 89: 161-174.