

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
PLANTEL IZTACALA**



**ESTUDIO DEL PROCESO DE CAPACITACION Y DE LA REACCION
ACROSOMAL EN ESPERMATOZOIDES DE CUYO
EN UN SISTEMA "IN VITRO"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A

RICARDO ALBERTO MORENO RODRIGUEZ

MEXICO, D. F.

1985



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 MIS PADRES: Alicia y Miguel Angel

A MIS HERMANOS: Silvia Martha, José Antonio, Luis Fernando,
Mario, Rosa Elena, Carlos y Miguel

MI AGRADECIMIENTO:

A la Dra. Adela Mújica de Hernández por su valiosa dirección, enseñanza, asesoría y paciencia durante la realización de este trabajo

A MIS COMPAÑEROS DE LABORATORIO: Angélica Aguilera

José Aceves

Mario A. Valdés

A Concepción Fierros por la mecanografía de este trabajo

Este trabajo se realizó bajo la dirección y en el laboratorio de la Dra. Adela Mújica de Hernández, del Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. Durante ocho meses se recibió ayuda económica de la Compañía Avon Cosmetics, S.A. de C.V.

I N D I C E

	Página
Lista de abreviaturas	1
Resumen	2
Introducción	5
Fertilización de los oocitos en los mamíferos	6
La necesidad de la capacitación en los espermatozoides de los mamíferos	7
La reacción acrósomal de los espermatozoides de los mamíferos	9
Medios de capacitación "in vitro"	10
Antecedentes relacionados al bicarbonato sobre el espermatozoide	12
Antecedentes relacionados entre la actina y tubulina con el espermatozoide	13
Objetivo	14
Material y Métodos	16
Reactivos	16
Medios de cultivo	16
Obtención de los espermatozoides	18
Lavado de los espermatozoides	19
Determinación de la concentración espermática	19
Preincubación de los espermatozoides	20

Valoración de la captación de los espermatozoides ..	21
Determinación de la reacción acrosomal	21
Métodos estadísticos	22
Resultados	23
Discusión	53
Conclusiones	61
Bibliografía	64

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

MCM	Medio mínimo de cultivo
mM	Milimolar
HCO ₃	Bicarbonato de <u>sodio</u>
Glu	Glucosa
NaCl	Cloruro de sodio
TEA	Trietanolamina
RA	Reacción acrosomal
x g	Número de veces la gravedad
μM	Micromolar
μl	Microlitro
SDS	Dodecil-sulfato de sodio

RESUMEN

En el presente trabajo se describe el efecto del bicarbonato y de la glucosa en la capacitación del espermatozoide de cuyo, así como la acción que la citocalacina B, inhibidor de lapolimerización de actina, y la colchicina, estimulador de la despolimerización de la tubulina "labil" y estabilizador de la tubulina "estable", ejercen sobre la capacitación y sobre la reacción acrosomal en estos espermatozoides.

Se seleccionó como medio de preincubación el más simple, la solución de cloruro de sodio 0.154 M, que se conocía no capacitaba a los espermatozoides (Valdés, 1981) y se determinó el efecto, del bicarbonato sobre la capacitación de los gametos, tanto en presencia como en ausencia de glucosa exógena. Se determinó además, si el efecto que presentó el bicarbonato podría atribuirse a su acción amortiguadora, para ello se le sustituyó por trietanolamina.

Para valorar la capacitación, después de la preincubación en las diferentes condiciones experimentales, los gametos fueron transferidos al medio mínimo de cultivo (MCM), el cual permite la expresión de la reacción acrosomal (RA) en los espermatozoides capacitados (Rogers y Yanagimachi, 1975; Mújica y Valdés, 1983). Así, la RA se tomó el criterio de capacitación y su valoración se hizo: a) cualitativamente por la observación al microscopio de luz de la presencia de espermatozoides sin acrosoma y con movimiento activado (Yanagimachi y Usui, 1974) y b) cuantitativamente,

por determinación del porcentaje de espermatozoides que perdían el acrosoma, en los primeros 15 min de la transferencia de las células al medio MCM.

Por otra parte, se valoró el efecto que la citocalacina B (100 μ M) y la colchicina (5 y 50 mM) tenían sobre la capacitación, cuando se adicionaron al medio de preincubación, y su efecto sobre la reacción acrosomal cuando la adición de las drogas se hizo en el medio de transferencia, MCM.

Se comprobó que la permanencia de los espermatozoides en NaCl o NaCl-Glu, hasta por 40 min, no les permitía capacitarse y que una más prolongada los dañaba. Cuando los espermatozoides se mantuvieron a 37°C por 45 min en NaCl-HCO₃ y fueron transferidos a MCM, presentaron la RA en un tiempo menor a los espermatozoides incubados en MCM desde el inicio. Pero si el tiempo de estancia, de los espermatozoides, en NaCl-HCO₃ tuvo una duración mayor a 80 min, al transferirlos a MCM la RA se presentó dentro de los primeros 15 min de la transferencia. Ahora cuando los espermatozoides se resuspendieron en NaCl-Glu-HCO₃ (25 mM de HCO₃) a 37°C a diferencia de lo observado en los mantenidos en NaCl, NaCl-HCO₃ o NaCl-Glu, los espermatozoides conservaron la movilidad, el movimiento era activo de vibración, y 45 min en el medio con bicarbonato y glucosa fueron suficientes para que al transferirlos a MCM presentaran la RA típica en los primeros 15 min. El efecto del bicarbonato no puede atribuirse únicamente a su acción

amortiguadora, ya que con treitanolamina como amortiguador, en sustitución del bicarbonato el número de espermatozoides capacitados fue significativamente menor.

Por la presencia de 100 μM de citocalacina o de 5 o 50 mM de colchicina en el medio de NaCl-Glu- HCO_3 o en el medio de la transferencia (MCM), no se observo efecto alguno, ni sobre la capacitación ni sobre la reacción acrosomal respectivamente; pero, sí sobre la movilidad de los gametos, ya que en aquellas muestras que contenían drogas los espermatozoides se inmovilizaron en forma más temprana.

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

Los estudios clásicos de la fecundación y del desarrollo embrionario temprano, han involucrado predominantemente el examen del comportamiento de los gametos de animales que presentan fertilización externa. Consecuentemente, la mayor parte del conocimiento en relación a la interacción de los gametos y la fertilización se deriva de las investigaciones en tales organismos, particularmente de los invertebrados marinos, debido a que sus gametos, por dos razones muy importantes, son ideales para estos estudios. La primera, la fertilización y el desarrollo subsecuente, realmente ocurren en el laboratorio por incubación de los gametos en agua del mar. La segunda, que se puede obtener un gran número de gametos de ambos sexos, lo cual facilita la investigación tanto a nivel bioquímico como molecular. En contraste a esta situación, existe un gran retraso en el conocimiento de la fertilización en los mamíferos, ya que, aún cuando los eventos básicos involucrados en la fertilización en estos dos grupos son similares, existen suficientes disparidades en su fisiología y morfología. Así, la protrusión del proceso acrosomal por el espermatozoide capaz de fertilizar y la unión inicial, al huevo, por medio de la confluencia de su membrana apical y con la membrana plasmática del gameto femenino, no ocurren en la fertilización en los mamíferos. El sitio de fertilización en los invertebrados es externo, mientras que en los mamíferos es interno, el oviducto, donde además el número de gametos que interaccionan es muy reducido,

ésto hace que el estudio de la interacción de los gametos "in situ" sea virtualmente imposible, además de que, el número relativamente pequeño de huevos liberados por cada animal constituye un enorme impedimento para las investigaciones cuantitativas (Bavister, 1980).

Fertilización de los ovocitos en los mamíferos

Debido a la inaccesibilidad a los gametos de los mamíferos en su ambiente natural, muchos investigadores han enfocado su atención al estudio de la fertilización, en muchas especies animales, bajo condiciones de cultivo "in vitro". Sin embargo, el progreso alcanzado ha sido lento. La mayor dificultad ha sido la de encontrar un ambiente de cultivo apropiado que mantenga a los gametos aptos: al espermatozoide, en condiciones viables durante la secuencia compleja de eventos, que le permiten la adquisición de la capacidad fertilizante, o capacitación; al óvulo, alcanzar el estado de madurez, cuando ha sido obtenido de los folículos preovulatorios, o el mantenerlo viable en el estado maduro hasta ser fertilizado, por el espermatozoide capacitado.

Una amplia variedad de medios de cultivo han sido utilizados para la fertilización "in vitro". Estos medios no corresponden a las condiciones reales que prevalecen en el sitio y en el momento de la fertilización, "in vivo". Bajo condiciones de cultivo, el ambiente proporcionado a los gametos es más o menos fijo, o estático; en contraste al medio que los rodea "in vivo", donde no hay

duda de que existe un intercambio dinámico y modulación del medio, en el cual los gametos interaccionan. Este control dinámico del ambiente que rodea a los gametos "in vivo", obviamente debe regular el curso de los eventos concernientes a la fertilización y al desarrollo embrionario temprano. Por otra parte, el éxito obtenido en las fertilizaciones "in vitro", que depende entre otros factores, de la habilidad de los gametos de las diferentes especies para tolerar las condiciones estáticas impuestas, ha permitido un avance en el entendimiento del proceso de la fertilización en los mamíferos.

La necesidad de la capacitación del espermatozoide

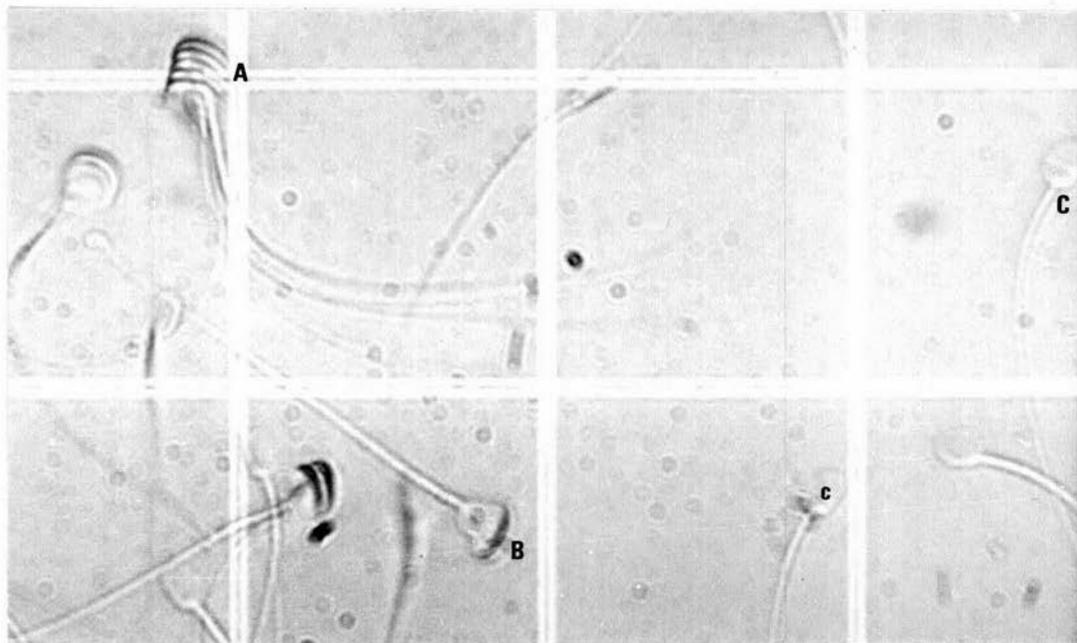
Una variedad de problemas específicos han bloqueado las investigaciones con los gametos de los mamíferos. Entre estos problemas específicos se encuentra el fenómeno de la "capacitación", ésto es: la necesidad del espermatozoide de los mamíferos de sufrir una clase de maduración o sensibilización, normalmente en el tracto reproductor de la hembra, antes de adquirir la capacidad de fecundar a los óvulos. La necesidad de que el espermatozoide sufra la capacitación fue descrita independientemente por Austin, 1951 y por Chang en 1951. Indudablemente la falta de conocimiento durante la primera mitad de este siglo, con respecto a la capacitación y sus implicaciones, fue el principal factor en la falla de muchos investigadores, para obtener la fertilización de los óvulos de mamífero "in vitro". El término de capacitación ha sido definido,

con diferentes significados, nosotros adoptaremos la definición de Bedford (1970): quien la considera como el conjunto de cambios que el espermatozoide debe sufrir durante el período de tiempo que debe ser incubado, ya sea en el tracto reproductor de la hembra o en un medio de cultivo "in vitro", antes de que pueda exhibir la reacción acrosomal (RA). Esta reacción acrosomal es un prerrequisito para la fertilización y es considerada como la secuela de la capacitación. Se han hecho esfuerzos para descubrir la naturaleza del cambio o cambios que sufre el espermatozoide durante este último proceso, con la esperanza de identificar un componente esencial de la fertilización. Sin embargo, con la tecnología existente, es difícil conocer si un cambio detectable corresponde a una etapa del fenómeno o sólo es una alteración secundaria o coincidente con el. No obstante, hoy se sugieren como cambios concomitantes con la capacitación, y que quizá formen parte de la misma, los siguientes: una pérdida de inhibidores de las enzimas acrosomales (Hartree, 1977); un rearreglo de antígenos de la membrana plasmática (Oliphant y Brackett, 1973); un rearreglo de partículas intramembranales, con formación de áreas de fosfolípidos libres de partículas (Friend, 1977; Bearer y Friend, 1982); una disminución de la relación colesterol/fosfolípidos, y como consecuencia un cambio en la fluidez de la membrana (O'Rand, 1977). Una disminución del ATP intracelular (Santos-Sacchi y col., 1982), un aumento en la movilidad de los espermatozoides (Johnson y col.,

1981; Austin, 1975), la fosforilación, de proteínas, dependiente de AMP_c (Huacuja y col., 1977), un mayor metabolismo glucolítico y oxidativo (Rogers y col., 1977). un incremento en los niveles de nucleótidos cíclicos (Garbes y Kopt, 1980) y además, un aumento en la permeabilidad al calcio (Yanagimachi y Usui, 1974).

La reacción acrosomal de los espermatozoides de los mamíferos

Se conoce que la capacitación es seguida, bajo condiciones favorables, por una modificación del acrosoma del espermatozoide, dicha alteración culmina con la exposición de la membrana acrosomal interna, por la ruptura y fusión de las membranas, acrosomal externa y membrana plasmática, con la pérdida de la matriz acrosomal, muchos de cuyos componentes son enzimas líticas (Allison y Hartree, 1970).



En la anterior microfotografía de campo claro (1060X) se muestran espermatozoides en empalizadas con acrosoma (A), espermatozoides sueltos con (B) y sin acrosoma (C).

Este cambio morfológico profundo del acrosoma espermático va acompañado de una activación del movimiento (Yanagimachi y Usui, 1975), estas características son referidas como "reacción acrosomal" (RA). La RA es iniciada por un movimiento de entrada de Ca^{++} bajo un gradiente electroquímico (Sign y col., 1978). La primera comunicación de la ocurrencia de la reacción acrosomal en los espermatozoides de los mamíferos, fue hecha por Austin y Bishop en 1958, y subsecuentemente descrita en detalle por numerosos investigadores (Green, 1978; Yanagimachi y Usui, 1974; Meizel, 1978). Actualmente se reconoce que la RA, es un prerrequisito para la fertilización en los mamíferos, y es en general similar, cuando menos en función, a los cambios acrosomales que suceden en los espermatozoides de muchas de las especies de animales inferiores, especialmente en los invertebrados marinos.

Métodos de capacitación "in vitro"

Con el desarrollo de métodos de capacitación "in vitro" se ha obtenido un gran avance en el conocimiento de los mamíferos relativos a la fertilización de los mamíferos.

La eficiencia de la capacitación a menudo está sujeta, a la forma en que se manejan los parámetros que son considerados críticos. Los principales parámetros que deben ser tomados en

consideración, que para algunas especies son singulares son:

1. el investigador mismo, su experiencia y habilidad en el manejo de las muestras.
2. el medio de cultivo utilizado.
3. la fuente de los espermatozoides, es decir, si son eyaculados u obtenidos del epidídimo.
4. la concentración de los espermatozoides.
5. el volumen durante la incubación.
6. el tiempo de la incubación
7. la forma de lavado de los espermatozoides.
8. la temperatura.
9. la fase gaseosa.
10. el pH del medio de cultivo y
11. la osmolaridad (Rogers, 1978).

La capacitación de los espermatozoides se valora indistintamente por los siguientes criterios:

- a) por el porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal
- b) por el porcentaje de óvulos penetrados
- c) por el inicio de la singamia y
- d) por el nacimiento exitoso del producto del óvulo fecundado, "in vitro", al ser implantado en la hembra adecuada. Nosotros tomaremos el criterio de la aparición de la reacción acrosomal como índice de la capacitación (Rogers, 1978).

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

Antecedentes relativos al efecto del bicarbonato sobre los espermatozoides

El oviducto y sus secreciones proveen del medio fisiológico, en el cual los espermatozoides de los mamíferos sufren dos procesos sucesivos: la capacitación y la reacción acrosomal, antes de adquirir la habilidad de fertilizar al óvulo. Se ha establecido que las secreciones del tracto genital de la hembra, estimulan el metabolismo energético (Stone y cols., 1973). Este efecto estimulador de los fluidos del tracto reproductor de la hembra se ha atribuido a la presencia del bicarbonato en ellos (Wales y Murdoch, 1971; Murdoch y White, 1968 a y b; Stone y cols., 1973; Foley y Williams, 1967). Aunque se reconoce que además del bicarbonato otros componentes de los mismos fluidos ejercen este tipo de estimulación (Foley y Williams, 1967; Iratani y cols., 1969; Stone y cols., 1973; Murdoch y Davis, 1978). La concentración de bicarbonato usada en los experimentos descritos por los autores mencionados fue hasta de 6 mM y se ha informado que la concentración de bicarbonato, en el útero de la coneja puede ser tan alta como 40 mM (Murdoch y White, 1968 b).

Barros en 1974 (tomado de Rogers y Yanagimachi, 1975) describió un medio de cultivo para los espermatozoides de cuyo, al cual denominó por sus características básicas (NaCl , CaCl_2 , NaHCO_3 , piruvato de sodio y lactato de sodio) como medio mínimo de cultivo (MCM). En este medio los espermatozoides se capacitan y expresan la RA después de un tiempo relativamente corto de iniciada la

incubación. La adición de glucosa (Glu) a este mismo medio retardó la expresión de la reacción acrosomal (Rogers y Yanagimachi, 1975), más tarde se indicó que la expresión tardía de la RA se debía a un retardo en la capacitación (Rogers y cols., 1979). Aunque recientemente Mújica y Valdés (1983) informaron que la glucosa sólo inhibía la expresión de la RA, sin inhibir la capacitación.

Antecedentes sobre las proteínas actina y tubulina, en los espermatozoides

La Actina. Tilney y colaboradores en 1973, mostraron que la polimerización rápida de la actina era responsable de la formación del proceso acrosomal, durante la reacción acrosomal del espermatozoide del erizo de mar. El proceso acrosomal es esencial para la fertilización en esta especie. La formación del proceso acrosomal no ocurre durante la reacción acrosomal en los espermatozoides de los mamíferos, pero, la proteína actina principal constituyente de los microfilamentos, sí ha sido identificada en los gametos masculinos de varias especies mamíferas: en los de hamster (Talbot y Kleve, 1978), en los del conejo, ratón y cuyo (Clarke y Yanagimachi, 1978) y en los del humano (Virtanen y cols., 1984). Esta proteína parece estar localizada preferentemente en el acrosoma y en la pieza medio de estas células.

La Tubulina. También esta proteína ha sido identificada en los espermatozoides de los mamíferos; como componente principal de los microtúbulos del axonema (Fawcett, 1975), aparato motor del

flagelo, pero también se le ha localizado en el acrosoma, en algunas especies: en el jabalí, por Peterson y cols., 1978 y en los del conejo y mono por Stambaugh y Smith (1978).

Los microtúbulos y los microfilamentos han sido involucrados en muy diversas funciones celulares, por ejemplo: en la movilidad (Abercrombie y cols., 1971), en el transporte de partículas citoplasmáticas (Fernandez y cols., 1970), en el mantenimiento de la forma (Mohri, 1976), en el control del movimiento lateral de proteínas integrales y de receptores (en Singer, 1979), así como en la liberación de tirosina (Williams, 1971).

Algunos autores han sugerido que estas dos proteínas, la actina (Tamblin, 1980; Talbot y Kleve, 1978; Clarke y Yanagimachi, 1978 y Johnson, 1975) y la tubulina (Peterson y cols., 1978 y Stambaugh y Smith, 1978) pueden participar durante los fenómenos de la capacitación y/o de la reacción acrosomal de los espermatozoides de los mamíferos; por ejemplo, en alguna función específica de las membranas, Virtane (1984) propone que sea durante la redistribución de partículas intercaladas en las membranas con la producción de zonas carentes de ellas - estas zonas sí han sido observadas en los espermatozoides capacitados (Friend y cols., 1977; Clarke y Yanagimachi, 1978).

Objetivo

Con base en los antecedentes mencionados nos planteamos los siguientes objetivos: investigar el papel del bicarbonato en

la capacitación de los espermatozoides del cuyo, así como, dilucidar la posible función que la actina y la tubulina pudiesen tener en los procesos de la capacitación, de la reacción acrosomal, o en ambas.

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

Reactivos

Los reactivos fueron obtenidos de las siguientes casas comerciales; nembutal de Smith Kline Norden de México; ácido láctico, cloruro de sodio, KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 formaldehido y dextrosa de J.T. Baker; piruvato de sodio y trietanolamina de Sigma Chemical Co.; Triton X-100 de BDH Chemical Ltd.

Medios de cultivo

Los medios de cultivo usados en este trabajo se muestran en la tabla I.

TABLA 1. MEDIOS DE CULTIVO⁺

MEDIO	COMPOSICION			
	NaHCO ₃	NaCL	TRITANOL AMINA (TEA)	GLUCOSA (GLU)
MCM ⁺⁺	25.07	105	-	-
NaCL	-	154	-	-
NaCL-11 HCO ₃	11	143	-	-
NaCL-25 HCO ₃	25	129	-	-
NaCL-45 HCO ₃	45	109	-	-
NaCL-GLU	-	151.14	-	-
NaCL-GLU-HCO ₃	25.07	126.07	-	5.56
NaCL-TEA	-	129.00	25	-
NaCL-GLU-TEA	-	126.14	25	5.56

⁺ LA CONCENTRACIÓN DE CADA COMPONENTE ESTA EXPRESADO EN MILIMOLARIDAD (MM).

⁺⁺ MEDIO MINIMO DE CULTIVO, QUE ADEMAS DE LO INDICADO CONTENIA: CaCl₂ 1.71 MM; PIRUVATO DE SODIO 0,5 MM Y ACIDO LACTICO 20 MM. EL PH SE AJUSTO A 7.8 CON NaOH 0.1 M. EL PH DE LOS MEDIOS RESTANTES SE AJUSTO A 7,6

Obtención de los espermatozoides

Las muestras espermáticas fueron obtenidas de los conductos deferentes de cuyos (*Cavia ssp*), de un peso promedio de 650 g, los cuales habían sido previamente anestesiados con pentobarbital sódico (50 mg/kg de peso), administrado por vía intraperitoneal. Ya anestesiados se les rasuró la parte abdominal, desde la última costilla hasta la bolsa escrotal, e inmediatamente después se les practicó una incisión cefalopodal en la línea sagital hasta alcanzar la cavidad visceral. Una vez localizados los testículos se procedió a cortar el músculo gubernáculum, que está unido a la cola del epidídimo, así como el músculo mesentérico y el cuerpo graso en su porción más alejada del testículo, cuidando de no romper los conductos deferentes. Estos fueron cortados, por la presión ejercida, al pinzarlos lo más cerca posible de su unión con la vesícula seminal y por separado cada conducto, fue ligado muy cerca del extremo pinzado, en seguida se colocaron en un matraz (de 125 ml) con solución salina a 37°C. Los conductos fueron posteriormente disecados, procurando bañarlos constantemente con la solución salina a 37°C. Una vez limpios, a los conductos se les hizo una incisión, muy cerca del extremo ligado, y por ella se introdujo una cánula y se procedió a cortar el extremo opuesto del conducto, en la unión con el epidídimo, y los espermatozoides se expulsaron fuera del conducto por inyección de 2 ml de solución de NaCl 0.154 M (a 37°C) y las células se colectaron en un tubo

de ensayo de vidrio.

Lavado de los espermatozoides

Los espermatozoides recién extraídos se observaron al microscopio de luz, (Fotomicroscopio Carl Zeiss Jena Mod. Docuval). Solamente se utilizaron aquellas muestras que presentaron un aspecto normal, es decir, espermatozoides con buena movilidad formando empalizadas y un escaso número de espermatozoides muertos, éstos se observaban sueltos con o sin acrosoma e inmóviles. Otro parámetro que se utilizó para la selección de las muestras, fue el de que presentaran una baja contaminación por otro tipo de células (menor del 0,1%). Las muestras seleccionadas se centrifugaron a 600 x g en una centrifuga clínica (Roto-Uni II) durante 4 min a temperatura ambiente. A los espermatozoides provenientes de cada conducto, empaquetados por centrifugación, a 600 x g por 4 min, se les retiró el líquido sobrenadante y las pastillas fueron resuspendidas en 1 ml de solución salina (37°C) por conducto. Las suspensiones de espermatozoides se mezclaron y centrifugaron en las condiciones arriba mencionadas y la pastilla se resuspendió en 1 ml de solución salina por conducto. De esta suspensión se tomó una muestra alícuota para determinar su concentración espermática, como se describe en seguida.

Determinación de la concentración de espermatozoides

Para determinar la concentración celular se tomaron 50 μ l de la suspensión de espermatozoides lavados y se diluyeron 21

veces en una solución de triton X-100 al 0.1%, en PBS (PBS: Na_2HPO_4 5.68 mM; KH_2PO_4 4.26; NaCl 132.44 mM). La mezcla se agitó en vórtex y el número de espermatozoides se contó utilizando una cámara de Neubauer. El cálculo de la concentración de espermatozoides se hizo por la siguiente fórmula:

$$\frac{N \times D}{H} = \text{espermatozoides en } 1.0 \text{ mm}^3. \text{ Este valor,} \\ \text{multiplicado } \times 10^3 = \text{espermatozoides por } 1.0 \text{ ml}$$

N = Número de espermatozoides contados dentro de la cuadrícula (1 mm²)

D = Dilución de la muestra

H = Altura de la cámara de Neubauer 0.1 mm

Preincubación de los espermatozoides

De la suspensión de espermatozoides lavados se tomaron muestras alícuotas entre 0.5 y 2 ml y se centrifugaron a 600 x g durante 4 min a temperatura ambiente. Los sobrenadantes se desecharon, y cada pastilla de espermatozoides fue resuspendida en el medio apropiado, para dar una concentración de 35×10^6 espermatozoides/ml y enseguida las muestras se pusieron en un baño de agua a 37°C, bajo atmósfera de aire. A diferentes tiempos de iniciada la preincubación se tomaron pequeñas muestras y se observaron al microscopio de luz (de 80 a 320 x) para valorar la movilidad y viabilidad de cada una de las muestras.

Valoración de la capacitación de los espermatozoides

A tiempos variables de la preincubación, realizada en las condiciones antes mencionadas, se obtuvieron muestras alícuotas de 0.3 ml a 0.5 ml de las suspensiones espermáticas, se centrifugaron a 600 x g, durante 4 min a temperatura ambiente. El sobrenadante de las pastillas fue sustituido por un volumen igual de medio MCM. Al hecho de cambiar a los espermatozoides, de su medio original de preincubación, al medio MCM, lo referiremos como "transferencia" y a las células las denominaremos espermatozoides transferidos. Los espermatozoides transferidos al medio MCM fueron de inmediato regresados al baño de incubación a 37°C.

Determinación de la reacción acrosomal (RA)

- a) Valoración cualitativa de la reacción acrosomal. Esta se hizo por observación al microscopio de luz, por lo general dentro de los primeros 15 minutos de transferidos los espermatozoides al MCM o a los tiempos en que se indica en cada caso particular de la presencia de espermatozoides sin acrosoma y con movimiento activado, características descritas por Yanagimachi y Usui en 1974.
- b) Valoración cuantitativa de la RA. La valoración cuantitativa se realizó por la determinación del porcentaje de espermatozoides carentes de acrosoma, en muestras alícuotas fijadas en formaldehído al 3% en PBS. Las muestras en las que se valoró cuantitativamente la RA fueron:

las suspensiones espermáticas en los medios de preincubación, a las que se les denominó espermatozoides sin transferir (A y B en las figuras) y en los espermatozoides transferidos (A' y B' en las figuras), en ambos casos, en muestras alícuotas fijadas de inmediato y otras a los 15 min de realizada la transferencia. Las muestras que se fijaron tanto de espermatozoides sin transferir, como de aquellas que sí lo fueron, su porcentaje de RA se valoró de la siguiente manera:

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

% RA = porcentaje de reacción acrosomal

ESA = número de Espermatozoides Sin
Acrosoma

NTE = Número Total de Espermatozoides
contados

Esta valoración se hizo de la cuenta de un mínimo de 200 espermatozoides, para ello se utilizó una cámara de Neubauer.

Métodos estadísticos

Los resultados fueron sometidos a la prueba de "t" de Student para datos no pareados, se utilizó sólo una cola para dar valor de la significancia a los resultados. Solamente se dan las porciones relevantes del análisis (en las Tablas o en el texto). En los resultados se da la media (\bar{X}) \pm la desviación estándar (D.E.) y entre paréntesis el número de experimentos (n).

R E S U L T A D O S

Comportamiento de los espermatozoides de cuyo durante su incubación en MCM

En todos los experimentos realizados, se incluyó una muestra de espermatozoides incubados en el medio mínimo de cultivo (MCM), la cual sirvió como referencia de la calidad de la muestra ensayada. En ella se valoró el comportamiento general de los espermatozoides; movilidad y agrupación, así como el tiempo de ocurrencia de la reacción acrosomal.

El comportamiento de los espermatozoides incubados en MCM fue del tipo descrito por otros autores (Yanagimachi y Usui, 1974). Es decir, los espermatozoides de cuyo, originalmente en empalizadas, presentaron muy buena movilidad desde el inicio de la incubación y se mantuvieron con un buen movimiento hasta por 2 h, máximo tiempo utilizado en este estudio. A los pocos minutos de iniciada la incubación; las empalizadas empezaban a agregarse, se unían entre sí por sus cabezas y formaban pequeñas rosetas, que en el transcurso del tiempo crecían en tamaño hasta presentarse como grumos grandes. Posteriormente se observaba una desagregación, y en general a los 60 min de iniciada la incubación podrían observarse espermatozoides sueltos, aún con acrosoma y un movimiento más activo. Esto era especialmente aparente con el inicio de la expresión de la reacción acrosomal, que era cuando se presentaban espermatozoides carentes de acrosoma cuyo flagelo se agitaba vigorosamente, en forma semejante a la de un látigo. El inicio de la reacción acrosomal en nuestras condiciones se observó, en

general, entre los 42-70 min de iniciada la incubación. Sin embargo, existieron muestras tardías en las que la RA se presentó hasta las dos horas. Además, se observó que en las muestras incubadas en MCM el número de espermatozoides muertos aumentaba con el tiempo de permanencia en el medio, ésto es, espermatozoides con o sin acrosoma inmóviles.

Efecto de la preincubación en NaCl, sobre el comportamiento de los espermatozoides transferidos a MCM

Valdés en 1981 informó que los espermatozoides de cuyo, lavados e incubados (37°C) en NaCl 0.154 M hasta por 1 hora, no se alteraban de manera visible ni se capacitaban.

Para determinar el tiempo de preincubación en NaCl, adecuado para no dañar el comportamiento de los gametos transferidos, se realizaron los experimentos siguientes:

Las células lavadas y resuspendidas en NaCl a 37°C durante 35, 45 y 55 min se inmovilizaron dentro de los primeros 5 min. Al transferir los espermatozoides a MCM, después de permanecer 35 min en NaCl, estos recobraron el movimiento de inmediato. En cambio, no todas las muestras que permanecieron por 45 min en NaCl recuperaron la movilidad al transferirlas a MCM y aquellas tratadas por 55 min, por lo general, ya no se reactivaron.

Efecto de la preincubación en NaCl-bicarbonato, sobre el comportamiento de los espermatozoides transferidos a MCM

Los espermatozoides lavados y preincubados en NaCl con bicarbonato (HCO_3 : 0, 11, 25 y 45 mM) se inmovilizaron dentro de los primeros minutos de su suspensión.

Transferidos al MCM, después de un período de 35 min, rápidamente readquirieron su movilidad, siendo mejor en aquellos espermatozoides que provenían de NaCl- HCO_3 25 mM. La valoración de la pérdida del acrosoma no mostró diferencias significativas, cuando se compararon las muestras preincubadas en presencia de bicarbonato, con el control sin bicarbonato, ni cuando la cuantificación se realizó en las muestras transferidas al MCM (Fig. 1). En este medio la reacción acrosomal se presentó primero en los espermatozoides que habían sido mantenidos en NaCl- HCO_3 que en aquellos que provenía de NaCl.

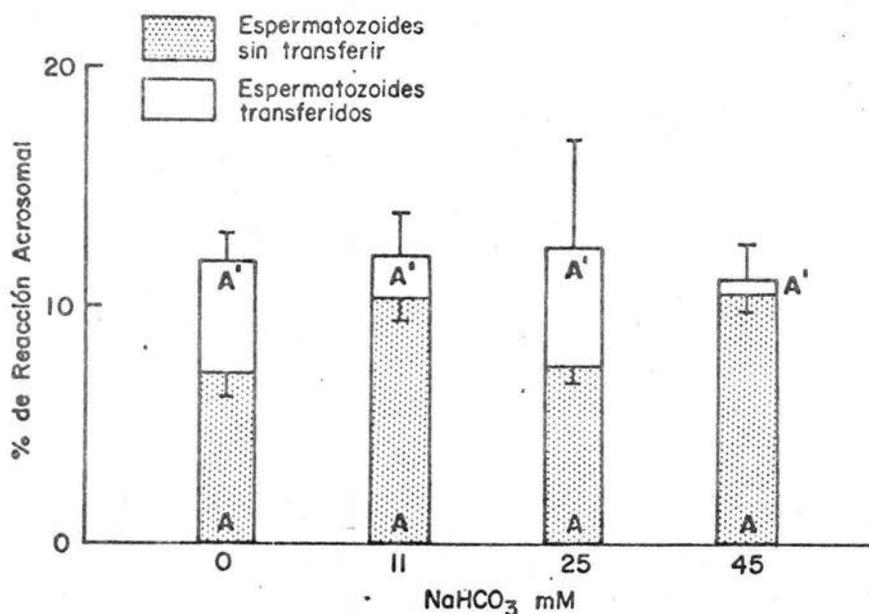


Fig. 1. Efecto de la preincubación en NaCl-HCO_3 , sobre la pérdida del acrosoma de los espermatozoides transferidos a MCM. Los espermatozoides de cuyo se preincubaron en solución de NaCl-HCO_3 (HCO_3^- : 0, 11, 25 y 45 mM) y a los 35 min se tomaron muestras alícuotas de 0.5 ml, se centrifugaron y el sobrenadante fue sustituido por MCM. A los 15 min de la transferencia se fijaron muestras alícuotas (A'), simultáneo con esta fijación se fijaron otras muestras de las suspensiones de espermatozoides no transferidos (A). La pérdida se valoró en las muestras fijadas. En la figura se presenta las $\bar{X} \pm \text{D.E.}$ ($n = 3$) de los porcentajes de la pérdida del acrosoma.

Efecto de la preincubación en NaCl-HCO₃-Glu, sobre el comportamiento de los espermatozoides transferidos a MCM

Los espermatozoides se preincubaron durante 45 min en: MCM, NaCl, NaCl-HCO₃ (HCO₃ : 25.05 mM), NaCl-Glu, (glu : 5.56 mM) NaCl-Glu-HCO₃ (Glu : 5.56 mM; HCO₃ : 11 y 25 mM). La concentración de NaCl la necesaria para completar 154 mM (Tabla 1). Durante los primeros minutos de permanencia, los espermatozoides resuspendidos en NaCl, NaCl-Glu o NaCl-HCO₃, perdieron su movilidad, mientras que los suspendidos en MCM o en NaCl-Glu-HCO₃ mantuvieron un buen movimiento, y el medio que contenía glucosa exógena el movimiento celular era de vibración.

Después de 45 min. de cada suspensión espermática, se tomo una muestra alícuota, se centrifugo y las células se resuspendieron en MCM. Los espermatozoides que provenían de NaCl, NaCl-Glu o NaCl-HCO₃, readquirieron una muy buena movilidad y presentaron un comportamiento muy similar al mostrado por los espermatozoides incubados desde el principio en MCM.

En los espermatozoides que provenían de NaCl y NaCl-Glu la reacción acrosomal se presentó entre los 50 y 70 min, posteriores a su transferencia a MCM. Por otra parte, sólo requirieron entre 20 y 40 min de incubación en MCM, para que los espermatozoides que provenían de NaCl-HCO₃, para expresar la RA, mientras que los espermatozoides mantenidos en NaCl-Glu-HCO₃ (11 o 25 mM) mostraron la RA, dentro de los primeros 5 min de su transferencia a MCM.

No hubo diferencia cualitativa ni cuantitativa en la expresión de RA, en los espermatozoides tratados en los medios NaCl-Glu-HCO₃ con 11 o 25 mM de HCO₃ (Fig. 2). Por último los espermatozoides en MCM a 37°C a los 45 min no mostraron aún RA, pero al cambiarlos a MCM nuevo, sí la presentaron y esta ocurrió dentro de los primeros 15 minutos. En la Fig. 3 se muestran los resultados, que las diferentes condiciones de preincubación tuvieron sobre el porcentaje de RA y los valores significativos de la prueba "t" de Student en la Tabla 2. Los pH medidos al inicio y al final de la preincubación fueron respectivamente: 6.67 y 6.70 para los espermatozoides preincubación en NaCl; 6.27 y 6.80 para los preincubados en NaCl-Glu; 7.79 y 8.42 los observados en NaCl-HCO₃; 8.08 y 8.45 para las muestras preincubadas en NaCl-Glu-HCO₃ y 7.80 y 8.4 en los incubados en MCM.

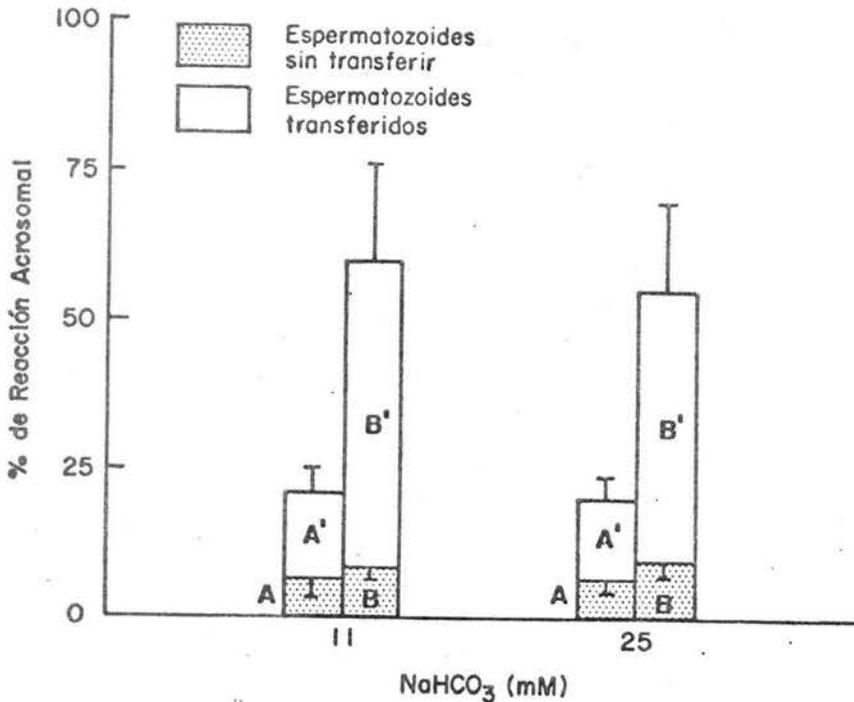


Fig. 2. Efecto del bicarbonato en la preincubación en NaCl-Glu sobre la expresión de la RA en los espermatozoides transferidos a MCM. Los espermatozoides de cuyo fueron mantenidos en solución de NaCl-Glu (5.56 mM) añadida de 11 o 25 mM de NaHCO₃. A los 45 min los espermatozoides se transfirieron a MCM. De estas suspensiones se fijaron dos muestras alícuotas a los 0 y 15 min de haber sido resuspendidos en MCM de los espermatozoides transferidos (A' y B') y de los no transferidos (A y B) respectivamente. La fig. muestra los porcentajes de la RA expresada como la $X \pm D.E.$ (n = 3).

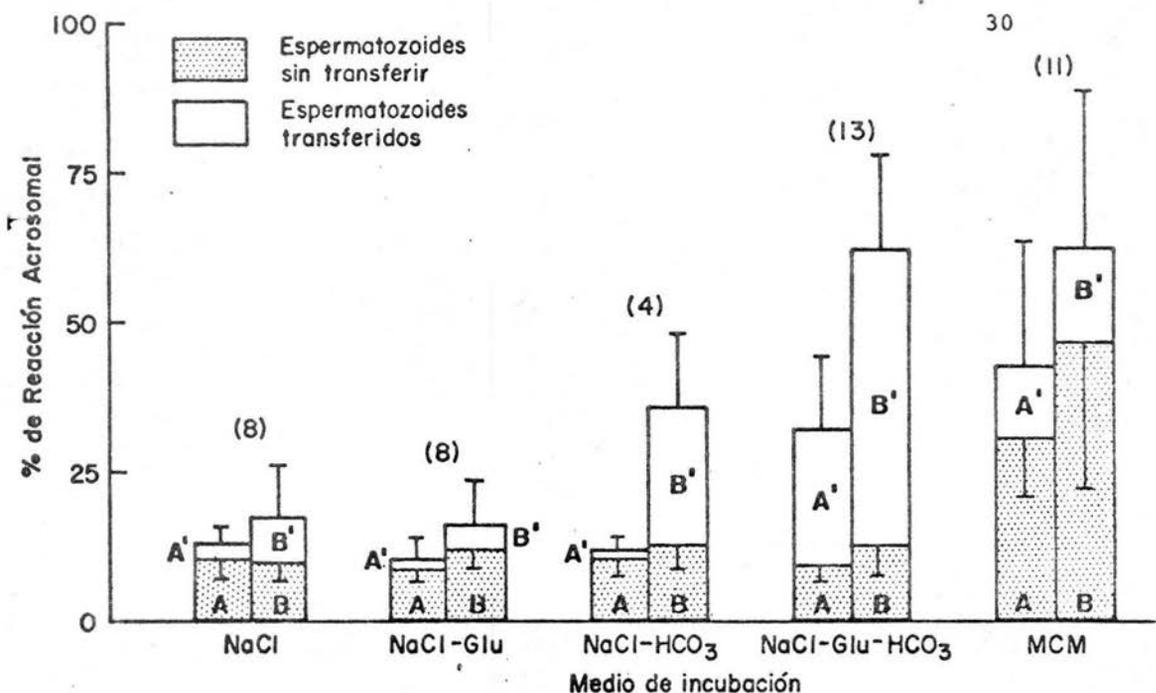


Fig. 3. Efecto de diferentes condiciones de preincubación, sobre el porcentaje de RA en los espermatozoides transferidos a MCM.

Los espermatozoides de cuyo fueron mantenidos en: NaCl, NaCl-Glu (5.56 mM), NaCl-HCO₃ (25.07 mM), NaCl-Glu-HCO₃ y en MCM. En esta serie de experimentos los espermatozoides en MCM se manejaron como las muestras experimentales. Después de una estancia de 45 min, en los medios indicados. Los espermatozoides se transfirieron a MCM, tanto de los espermatozoides transferidos como de aquellos que no lo fueron se fijó, en formaldehído, una muestra alicuota (A') y a los 15 min se fijó una

segunda muestra alícuota (B'). Simultáneo a la fijación de las muestras transferidas, se fijaron muestras alícuotas de la suspensión de espermatozoides no transferidos (A y B). En la Figura se muestran los $\bar{X} \pm DE$ y el número de experimentos, se da entre paréntesis. Los valores significativos de la prueba "t" de Student se dan en la Tabla 2.

Tabla 2. Sumario de las diferencias significativas obtenidas de la prueba de "t" de Student aplicada a los experimentos mostrados en la Fig. 3

(A':A') ⁺			
	NaCl	NaCl-Glu	NaCl-HCO ₃
NaCl-Glu-HCO ₃ ⁺⁺	0.0005	0.0005	0.005
(B':B') ⁺			
	NaCl	NaCl-Glu	NaCl-HCO ₃
NaCl-Glu-HCO ₃ ⁺⁺	0.0005	0.0005	0.005
NaCl-HCO ₃	0.005	0.005	
(A':B') ⁺			
	NaCl-Glu	NaCl-HCO ₃	NaCl-Glu-HCO ₃
NaCl-Glu	0.025		
NaCl-HCO ₃		0.025	
NaCl-Glu-HCO ₃ ⁺⁺			0.025

⁺⁺ NaCl-Glu-HCO₃ o MCM

+Entre paréntesis las muestras que se comparan

Efecto de la sustitución del bicarbonato por trietanolamina, en el medio de preincubación, sobre la expresión de la reacción acrosomal en los espermatozoides transferidos a MCM

Por la presencia del bicarbonato en los medios de preincubación, NaCl-HCO_3 y NaCl-Glu-HCO_3 , los espermatozoides al ser transferidos al MCM mostraron la RA en forma más temprana, que los tratados en NaCl .

Para valorar si el efecto del bicarbonato podría deberse a su acción amortiguadora, al bicarbonato se le sustituyó por otro amortiguador, la trietanolamina (TEA) a la misma concentración, 25 mM final.

Los espermatozoides se preincubaron en NaCl-HCO_3 o en NaCl-TEA , NaCl-Glu-HCO_3 o NaCl-Glu-TEA durante 45 min y en seguida se pasaron al medio MCM, donde se continuó su incubación.

Los espermatozoides suspendidos en los medios NaCl-HCO_3 o en NaCl-TEA , se inmovilizaron dentro de los primeros minutos de iniciada la preincubación, no así los espermatozoides en NaCl-Glu-HCO_3 o NaCl-Glu-TEA , en estos medios los espermatozoides conservaron su movilidad durante todo el tiempo que se observaron, 2 h.

Los espermatozoides provenientes del medio NaCl-HCO_3 , en MCM recobraron la movilidad en mejor manera que los tratados en NaCl-TEA y la RA se presentó en ambas muestras dentro de los 25-50 min siguientes a su transferencia. Pero en los provenien-

tes del medio NaCl-TEA la movilidad flagelar de los espermatozoides con RA era muy pobre.

Los espermatozoides que se mantuvieron en NaCl-Glu-HCO₃ o en NaCl-Glu-TEA, al pasarlos a MCM presentaron la RA dentro de los primeros minutos de su transferencia, aunque un menor número cuando los espermatozoides provenían del medio NaCl-Glu-TEA. Los datos cuantitativos de la pérdida del acrosoma se muestran en la Fig. 4 y el resumen del análisis de la prueba de "t" de Student en la Tabla 3.

Los pHs iniciales y finales, valorados durante la preincubación de los espermatozoides fueron los siguientes respectivamente: en NaCl-HCO₃ 8.08 y 8.45; en NaCl-TEA 8.15-8.21; en NaCl-Glu-HCO₃ 8.20 y 8.50 y en NaCl-Glu-TEA 8.17 y 8.20.

En un experimento los espermatozoides se preincubaron 45 min en el medio NaCl-Glu-HCO₃ pH 7.0 y NaCl-Glu-TEA pH 7.6. Los pHs valorados durante este tiempo fueron: en el primer medio 7.15 al inicio y al final de 7.9; en los espermatozoides que estuvieron en el medio NaCl-Glu-TEA sus pHs inicial y final fueron 8.12 y 8.14, respectivamente. Transferidos a MCM ambas muestras mostraron RA en los primeros 15 min de la transferencia. Nuevamente se observó un mayor número de espermatozoides con RA y con mayor movimiento, en los provenientes del medio que contenía bicarbonato. Cabe señalar que, en dos experimentos en los que se realizó la preincubación de los espermatozoides en NaCl-Glu-HCO₃

por tiempos menores a los descritos, 5 y 20 min, se observaron espermatozoides con RA, en ambos casos, dentro de los primeros 15 min de la transferencia a MCM, pero el número de espermatozoides con RA fue menor, al observado en los espermatozoides preincubados durante 45 min en este mismo medio.

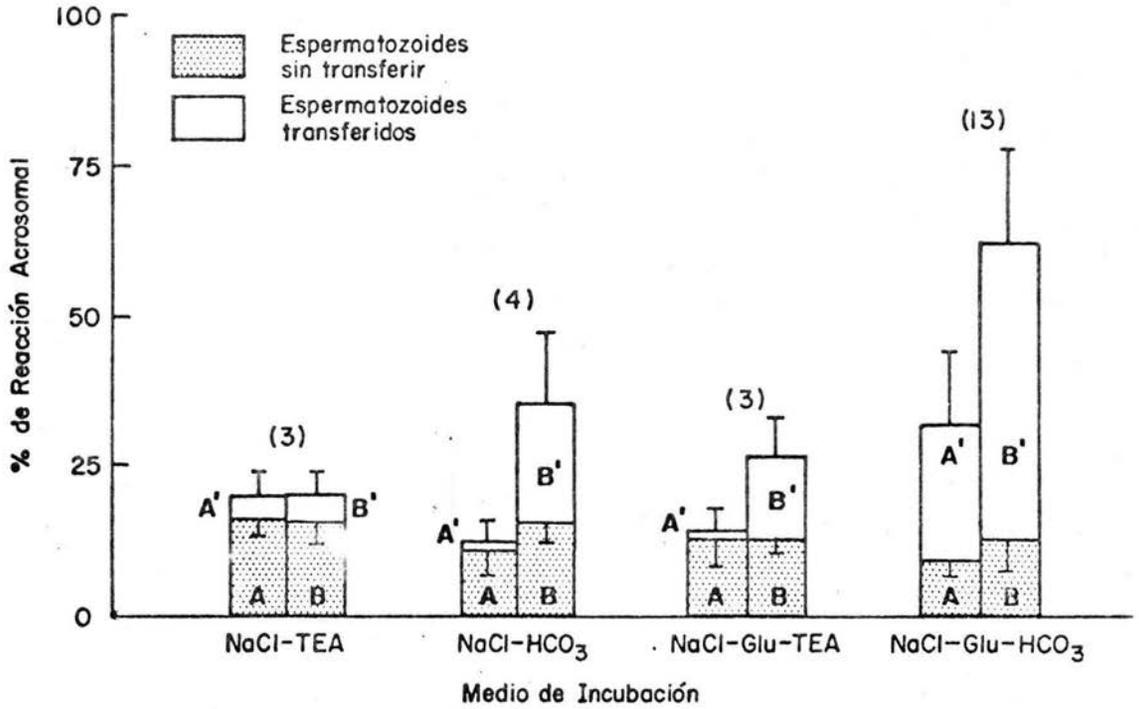


Fig. 4. Efecto de sustitución del NaHCO_3 por trietanolamina (TEA) sobre la expresión de la reacción acrosomal en los espermatozoides transferidas a MCM. Las siguientes soluciones fueron utilizadas para la preincubación de los espermatozoides: NaCl-TEA ; NaCl-HCO_3 ; NaCl-Glu-TEA y NaCl-Glu-HCO_3 . La concentración del HCO_3 o de la TEA fue 25.07 mM. Después de 45 min, los espermatozoides se centrifugaron y se resuspendieron en MCM. Se fijaron

dos muestras alícuotas de los espermatozoides transferidos (A' y B') y simultaneamente de los no transferidos (A y B), a los cero y 15 min de la transferencia. En la figura 3 se muestran las $\bar{X} \pm D.E$ del porciento de espermatozoides sin acrosoma, el número de experimentos se muestra entre paréntesis. Los valores significativos de la prueba "t" de Student para estos datos, se dan en la Tabla 3.

Tabla 3. Sumario de las diferencias significativas (P) obtenidas de la prueba de "t" de Student, aplicada a los experimentos de la Fig. 4

(A':A') [†]			
	NaCl-TEA	NaCl-HCO ₃	NaCl-Glu-TEA
NaCl-Glu-HCO ₃	0.0005	0.005	0.005
(B':B') [†]			
	NaCl-TEA	NaCl-HCO ₃	NaCl-Glu-TEA
NaCl-Glu-HCO ₃	0.0005	0.005	0.0005
(A':B') [†]			
	NaCl-HCO ₃	NaCl-Glu-HCO ₃	NaCl-Glu-TEA
NaCl-HCO ₃	0.025		
NaCl-Glu-HCO ₃		0.0005	
NaCl-Glu-TEA			0.025

[†]Entre paréntesis las muestras que se comparan

Efecto de la concentración de bicarbonato en preincubaciones de mayor duración sobre la expresión de la reacción acrosomal de los espermatozoides transferidos a MCM

Hemos indicado que, los espermatozoides que permanecen durante 45 min en NaCl y concentraciones variables de bicarbonato, al ser transferidos a MCM mostraron en este medio la reacción acrosomal en forma más temprana, que los espermatozoides que habían sido mantenidos, por el mismo lapso de tiempo, en NaCl sin bicarbonato.

Los siguientes tres experimentos se efectuaron para conocer el efecto que la concentración de bicarbonato pudiera tener, durante una preincubación de los espermatozoides por tiempo más prolongado, sobre la expresión de su RA en MCM.

Los espermatozoides suspendidos en NaCl 154 mM y en esta solución más bicarbonato 11, 25 o 45 mM. Se realizó por un tiempo variable de 85 a 120 min, tiempo que dependió de la presentación de RA, de los espermatozoides incubados en forma paralela en el medio MCM, como control. Es decir, cuando la RA fue observada en el control, la preincubación de las muestras ensayadas se suspendió y los espermatozoides se transfirieron al MCM, donde se continuó su incubación.

Los espermatozoides en NaCl o en NaCl más bicarbonato, presentaron el comportamiento habitual. En MCM, los espermatozoides provenientes de NaCl-HCO₃ recuperaron su movilidad, mientras que las muestras que habían permanecido en NaCl sólo, la

readquirieron ocasionalmente. Además, las muestras transferidas de NaCl-HCO₃ presentaron la RA en los primeros minutos de su cambio a MCM. La RA no fue igual en todas las muestras; ni el número de células que la presentaban, ni en las características de los espermatozoides con RA, siendo más típica en los espermatozoides que fueron preincubados en NaCl con 25 mM de bicarbonato. Los resultados del porcentaje de la pérdida del acrosoma, se muestran en la Fig. 5 y el sumario de los valores significativos, del análisis de la prueba de "t" de Student, en la Tabla 4.

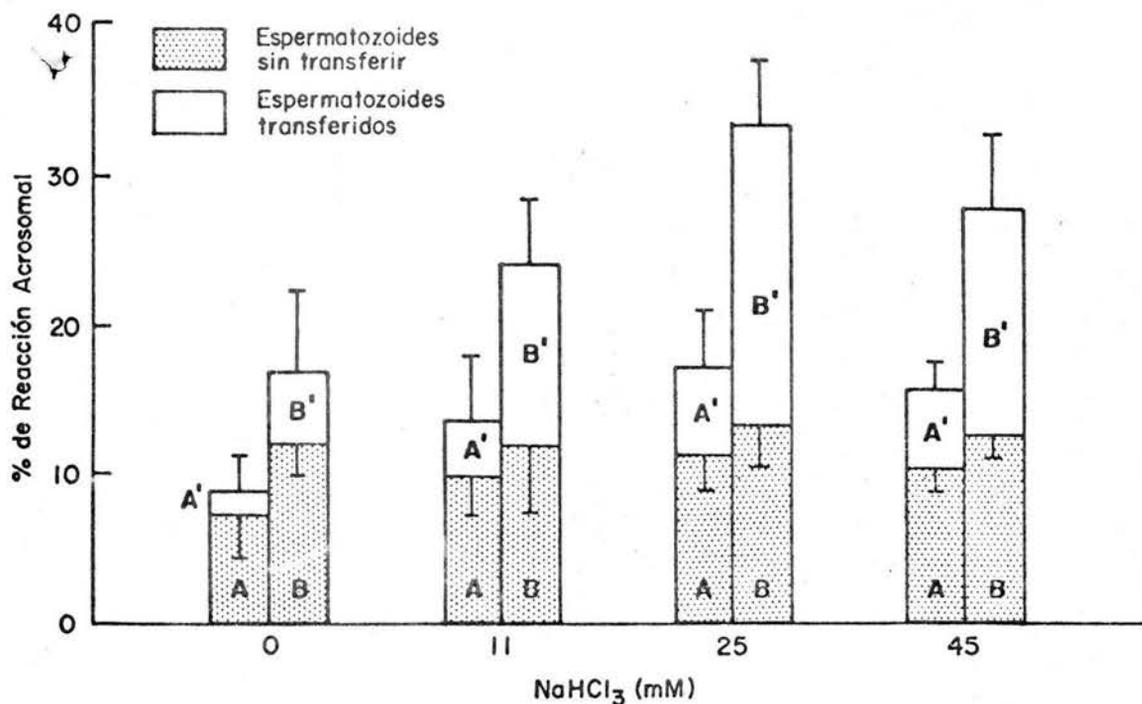


Fig. 5. Efecto de la concentración de bicarbonato en preincubaciones de mayor duración sobre la expresión de la reacción acrosomal de los espermatozoides transferidos a MCM

Los espermatozoides de cuyo mantenidos a 37°C y a una concentración de 35×10^6 células/ml en MCM o en NaCl 154 mM o en esta solución más NaHCO₃ a las concentraciones indicadas en la figura. Después de mantener a los espermatozoides por tiempos variables vease el texto, se tomaron muestras alícuotas de los

medios utilizados de 0.5 ml, se centrifugaron y la pastilla se resuspendió en MCM. Se fijaron dos muestras alícuotas, en las condiciones habituales (vease Fig. 2 o 3) de los espermatozoides transferidos (A' y B') y dos de los no transferidos (A y B). En la figura se muestran las $\bar{X} \pm D E$ (n = 3) del porciento de espermatozoides sin acrosoma, valorado en las muestras fijadas. Los valores significativos de la prueba de "t" de Student se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Sumario de las diferencias significativas, obtenidas de la prueba de "t" de Student, aplicada a los experimentos de la Fig. 5.

	(A':A') [†]		
	NaCl	NaCl-11 HCO ₃	NaCl-45 HCO ₃
NaCl-25 HCO ₃	0.01	0.1	0.1
NaCl-45 HCO ₃	0.025		
	(B':B') [†]		
	NaCl	NaCl-11 HCO ₃	
NaCl-25 HCO ₃	0.01	0.05	
NaCl-45 HCO ₃	0.025		
	(A':B') [†]		
	NaCl-11 HCO ₃	NaCl-25 HCO ₃	NaCl-45 HCO ₃
NaCl-11 HCO ₃	0.025		
NaCl-25 HCO ₃		0.005	
NaCl-45 HCO ₃			0.025

[†] Entre paréntesis las muestras que se comparan

Efecto de la presencia citocalacina B en el medio de la preincubación y en el de transferencia sobre la reacción acrosomal

Anteriormente hemos indicado que la permanencia de los espermatozoides de cuyo en NaCl-Glu-HCO_3 por 45 min, fue un tiempo suficiente para que al transferirlos a MCM sufrieran la reacción acrosomal, dentro de los primeros minutos. Peterson y Freund en 1977 informaron que la adición de 100 μM de citocalacina B, a una muestra de espermatozoides, inhibía la movilidad y la glucólisis en un 50% de la población celular, por inhibir el transporte de la glucosa.

Con base en lo anterior los espermatozoides se preincubaron a 37°C por 45 min en NaCl-Glu-HCO_3 , con o sin 100 μM de citocalacina B. Se observó que la droga sólo disminuyó la movilidad, ya que al transferir los espermatozoides a MCM, la pérdida del acrosoma fue muy similar a la mostrada por los espermatozoides provenientes del medio carente de citocalacina, Fig. 6.

Cuando los espermatozoides se mantuvieron por 45 min en NaCl-Glu-HCO_3 y se transfirieron a MCM, con 100 μM de citocalacina o MCM sin la droga, se observó que por la presencia del compuesto, en el medio de transferencia, también se disminuyó ligeramente la movilidad espermática; pero la citocalacina no afectó la pérdida del acrosoma, cuando se comparó con la mostrada por los espermatozoides control, Fig. 7.

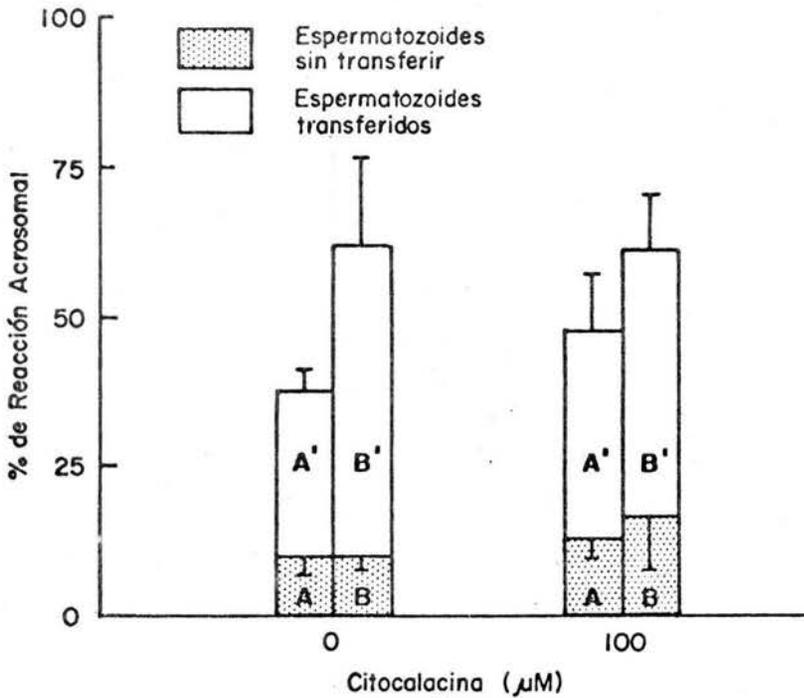


Fig. 6. Efecto de la presencia de la citocalacina B en el medio de preincubación sobre la RA.

Los espermatozoides de cuyo se preincubaron en NaCl-Glu-HCO₃ o en este medio con 100 μM de citocalacina B. A los 45 min se tomaron muestras alícuotas de 0.5 ml, se centrifugaron y el sobrenadante fue sustituido por MCM. De las muestras espermáticas transferidas, así como de las no transferidas, se fijaron muestras alícuotas en las mismas condiciones indicadas en

Fig. 2. En la Fig. se muestra la $\bar{X} \pm$ D.E (n = 3) del porcentaje de espermatozoides sin acrosoma. En las muestras transferidas hubo un incremento significativo (P < 0.05) en la pérdida del acrosoma, entre los 0 y 15 min valorados.

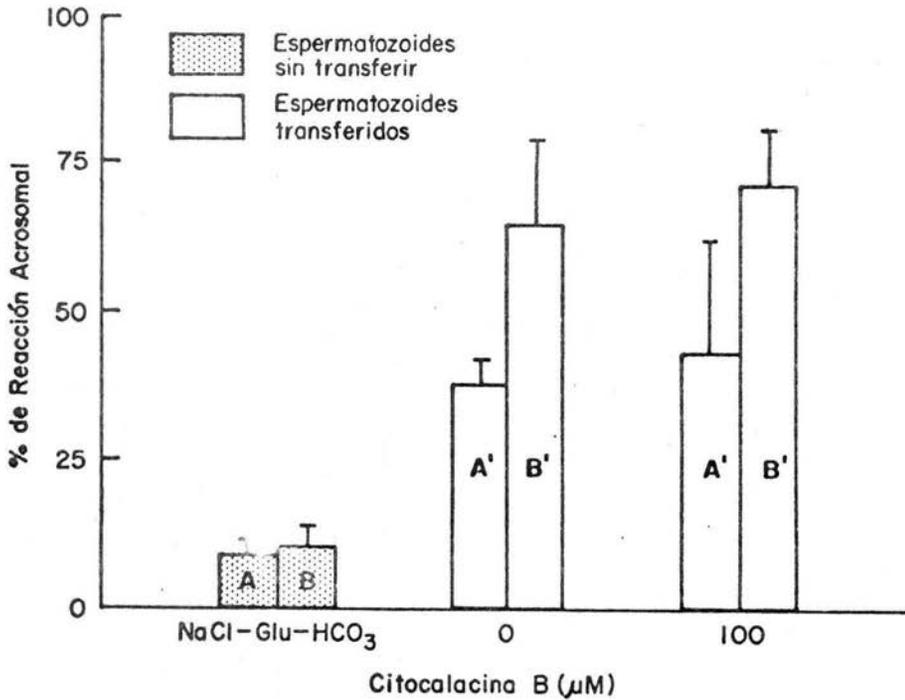


Fig. 7. Efecto de la citocalcine B en el medio de transferencia sobre la expresión de la reacción acrosomal. Los espermatozoides de cuyo se mantuvieron a 37°C en solución de NaCl-Glu-HCO₃. A los 45 min se tomaron muestras y se transfirieron a MCM, o a MCM con 100 μM de citocalcine B. Simultaneamente tanto de las muestras espermáticas transferidas como de las que no lo fueron,

se fijaron muestras alícuotas a los cero y 15 min de la transferencia. En esta figura se muestra la $\bar{X} \pm D.E.$ ($n = 3$) del porcentaje de espermatozoides sin acrosoma. Los valores de "P" de la prueba de "t" de Student para las muestras fijadas inmediatamente (A') contra las fijadas 15 min después de ser transferidas (B') fue menor de 0.05, tanto para el control sin cito B, como para el transferido a MCM con cito B.

Efecto de la colchicina en el medio de preincubación y en el medio de transferencia sobre la RA

El efecto de la colchicina (0, 5 o 50 mM) sobre los espermatozoides se probó durante 45 min en NaCl-Glu-HCO₃.

La movilidad espermática disminuyó en relación directa a la concentración de colchicina en el medio y los tratados con 50 mM de la droga se inmovilizaron a los 75 min; mientras que en la muestra control o con la concentración baja de la droga, las células se mantuvieron móviles hasta cuando menos dos horas.

Al transferir los espermatozoides a MCM, provenientes de los 3 medios utilizados, la pérdida del acrosoma fue muy similar entre ellos (Figura 8).

Para observar el efecto de la colchicina durante la expresión de la reacción acrosomal, los espermatozoides se mantuvieron por 45 min a 37°C en NaCl-Glu-HCO₃ y se transfirieron a MCM añadido de colchicina (0, 5 o 50 mM).

La movilidad de los espermatozoides, transferidos al MCM con colchicina disminuyó, y en forma más pronunciada en el MCM con 50 mM de colchicina, inclusive, estos espermatozoides se inmovilizaron a los 35 min de su transferencia. El porcentaje de espermatozoides que perdieron el acrosoma durante la preincubación y en la transferencia, no se observó diferencias significativas por el efecto de la droga a ninguna de las dos concentraciones (5 o 50 mM), pero sí entre los espermatozoides transferidos a MCM sin colchicina a los cero min (A') y los 15 (B') de su transferencia (Fig. 9)

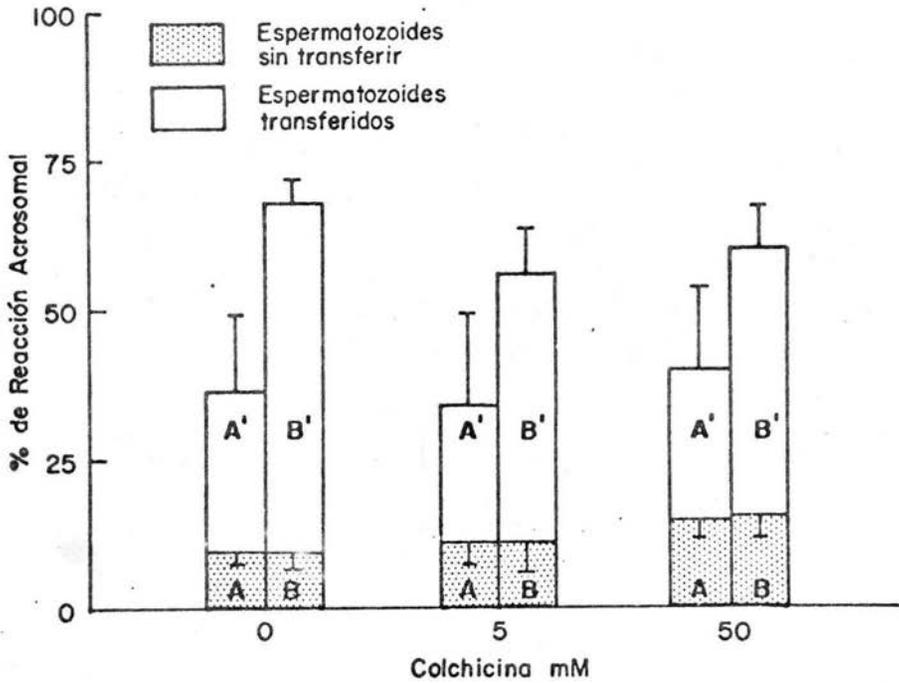


Fig. 8. Efecto de la colchicina sobre la capacitación de los espermatozoides de cuyo en el medio NaCl-Glu-HCO_3 . Los espermatozoides se preincubaron en solución de NaCl-Glu-CHO_3 o en este mismo medio añadido de colchicina (5 o 50 mM). Después de 45 min de permanencia en los medios se tomaron muestras alícuotas y se centrifugaron. A las pastillas de espermatozoides, se les sustituyó el sobrenadante por la misma cantidad de MCM. Se fijaron dos muestras alícuotas, tanto de las muestras transferi-

das, y simultaneamente en las no transferidas, a los cero y 15 min de la transferencia. En la figura se muestra la $\bar{X} \pm$ D.E. (n = 3) del porcentaje de espermatozoides sin acrosoma. $P < 0.05$ entre las muestras fijadas inmediatamente después de la transferencia (A') contra las fijadas 15 min después (B') y que habían sido preincubadas en cualquiera de los 3 medios.

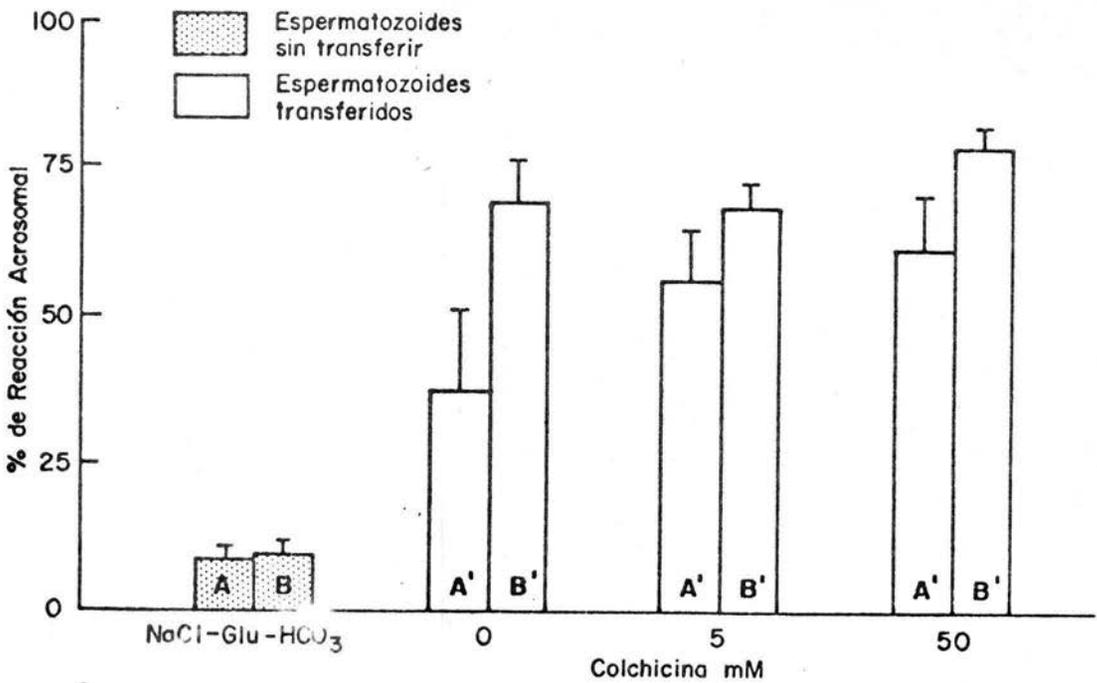


Fig. 9. Efecto de la colchicina en el medio de la transferencia sobre la reacción acrosomal de espermatozoides de cuyo. Los espermatozoides se mantuvieron durante 45 min en solución de NaCl-Glu-HCO₃, se centrifugaron y el sobrenadante fue substituído por la misma cantidad de MCM o MCM añádidó de colchicina (5 o 50 mM). Se fijaron muestras alícuotas a los cero y 15 min después de la transferencia, en la forma y a los tiempos en que se indica en la Fig. 2. En la figura se muestran los resultados relativos a la $\bar{X} \pm D.E$ (n = 3) del porcentaje de la pérdida del acrosoma.

D I S C U S I O N

Santos-Sachi y Gordon en 1982 comunicaron que la capacitación de los espermatozoides de cuyo ocurría en el medio de Biggers, Whitten y Whittinghan (BWW) con albúmina y sin sustratos exógenos. Durante la incubación los niveles de ATP intraespermáticos disminuyeron, hecho que los autores sugirieron podría inhibir a la Ca-ATP_{asa} membranal, transportadora de calcio, lo cual permitiría la entrada pasiva de calcio del medio de incubación al espermatozoide y desencadenaría el proceso de la capacitación. Una disminución en los niveles de ATP durante la capacitación, había sido informada por Rogers y Morton en 1973. La pérdida del funcionamiento de la Ca-ATP_{asa} durante la capacitación, se ha asociado con la desestabilización de la membrana plasmática del espermatozoide de cuyo (en Santos-Sachi y Gordon, 1982), esta Ca-ATP_{asa} la identificó Gordon en 1973, en los espermatozoides epididimales de conejo. Por lo antes mencionado, se podría pensar que en los espermatozoides incubados en solución de NaCl, podrían ocurrir estos mismos fenómenos. Sin embargo, Valdés (1981) comunicó que los espermatozoides de cuyo incubados en NaCl hasta por dos horas, no se capacitan. En nuestras condiciones los espermatozoides de cuyo preincubados en NaCl, tampoco se capacitaron, esto podría deberse a que el NaCl no contiene Ca²⁺ ni capacidad amortiguadora o algún otro factor que s' este presente en el medio BWW. Sin embargo,

con la adición de NaHCO_3 al NaCl el fenómeno de capacitación, observado por Santos-Sachi y Gordon, se produjo. En nuestro medio, el de calcio sólo está en forma contaminante (aproximadamente $5 \mu\text{M}$). En 1982 Garbers y cols. informaron que el efecto, por ellos observado, del bicarbonato, sobre la elevación de AMP cíclico dependiente de calcio, podía deberse a que; el HCO_3 estimulara la captación de calcio o facilitara su unión a sitios moduladores o bien por una acción movilizadora sobre el calcio almacenado en la mitocondria y como resultado, de cualquiera de estas proposiciones, se permitiría el proceso de capacitación. Estas consideraciones podrían también explicar nuestra observación relativa a la necesidad de bicarbonato en el medio y no de otro amortiguador, como la trietanolamina. Sin embargo, Hyne y Garbers en 1981 informaron que en el medio MCM amortiguado con trietanolamina la expresión de la reacción acrosomal ocurría en forma similar a cuando el medio estaba amortiguado con bicarbonato. Esta discrepancia con nuestros datos, podría deberse a la presencia de los otros constituyentes del medio MCM.

Cuando al medio NaCl-HCO_3 se le adicionó glucosa, ocurrió una disminución del tiempo de capacitación espermática con respecto al observado en la incubación en NaCl-HCO_3 . Tomando en consideración la proposición de Santos-Sachi y Gordon de que una disminución en los niveles de ATP desencadena el proceso de capacitación, el efecto de la glucosa sobre la capacitación

tendría que explicarse, por una mayor disminución, quizá localizada, en los niveles de ATP. Hammersted y Lardy en 1983 informaron que la glucólisis en el espermatozoide puede, bajo algunas condiciones, tener una producción neta de ATP de cero. Además se describió que la reacción acrosomal ocurre en la cabeza del espermatozoide, la cual se encuentra aislada del flágeo, donde la mayor cantidad de energía es producida por vía mitocondrial. Una menor producción de ATP por la presencia de la glucosa, podría acarrear una mayor deficiencia de ATP en la cabeza, con lo cual se puede explicar que la capacitación ocurriera. El gasto de ATP podría estar asociado al movimiento activo de vibración, que posee el espermatozoide cuando se incuba en presencia de glucosa; la cual además de capacitar, se ha comunicado que inhibe la expresión de la reacción acrosomal (Mújica y Valdés, 1983).

Otra posible explicación de los resultados, sería la de que el bicarbonato pudiera estimular la liberación de algunos componentes superficiales, cuya separación se piensa que es parte de la capacitación (Brackett y Oliphant, 1975), esta liberación podría aún ser incrementada por la presencia de la glucosa.

Otra alternativa de la acción del bicarbonato sería la de participar sobre alguna(s) vía(s) metabólica(s). Se ha informado de la capacidad del HCO_3^- de estimular en el espermatozoide de jabalí el metabolismo oxidativo, sin alterar apreciablemente la glucólisis (Murdoch y Davis, 1978). En espermatozoides de

carnero, por el contrario, el bicarbonato estimula más a la glucólisis que a la respiración (Murdoch y White, 1971), mientras que en el espermatozoide de conejo se estimulan, tanto la glucólisis como la respiración (Murdoch y White, 1968). Además, se ha informado la posibilidad de que la carboxilación de compuestos de tres átomos de carbono, con la producción de compuestos de cuatro carbonos tales como; malato u oxalacetato, los cuales podrían a través del ciclo de Krebs estimular el consumo de oxígeno. Este fenómeno parece ocurrir en espermatozoides de carnero y de toro (O'Shea y Wales, 1967), pero no en espermatozoides de jabalí (Murdoch y Davis, 1978). Estas observaciones sugieren que el bicarbonato actúa sobre el metabolismo espermático, aunque el sitio específico de su acción difiera de especie a especie. La capacidad del bicarbonato de alterar el metabolismo celular, no está confinada al espermatozoide, sino que también es conocido que ejerce un profundo efecto sobre otras células de mamíferos y sobre la actividad de algunas enzimas "in vitro", tales como: la fosfoenolpiruvato cinasa, la gliceraldehído 3 fosfatodeshidrogenasa, la carboxi cinasa, la aconitasa, la glucosa-6-fosfato dehidrogenasa y la glucosa-6-fosfato fosforilasa (McDaniel y col., 1971).

Murdoch y Davis (1978) sugirieron, basados en el efecto que los inhibidores de la fosfodiesterasa o análogos del AMP cíclico tienen sobre el metabolismo espermático (Garbers y col., 1973), la posibilidad de que exista una relación entre el bicarbonato,

los niveles de AMP cíclico y el metabolismo espermático. Recientemente se informó de la necesidad del bicarbonato para que el calcio pueda inducir una elevación de AMP cíclico en los espermatozoides de cuyo (Garbers y col., 1982), sin embargo, en estos experimentos no se buscó una relación directa con el metabolismo, aunque sí se observó una posible relación entre los niveles de AMP cíclico con la capacitación.

El piruvato, el lactato (Roger y Yanagimachi, 1975; Rogers y col., 1977) y la glucosa (Mújica y Valdés, 1983), se han sugerido que juegan un papel importante en el control de la capacitación y de la reacción acrosomal. Es posible pensar que el bicarbonato, debido a su efecto sobre el metabolismo, pueda modular la capacitación y la reacción acrosomal, por controlar el metabolismo de los sustratos antes mencionados, posiblemente, por estimular alguna(s) de las enzimas anteriormente mencionadas.

De los datos mostrados en este trabajo podemos sugerir que la solución, NaCl-HCO_3 (HCO_3 25 mM), es el medio de incubación más simple en el cual los espermatozoides del cuyo pueden capacitarse.

Por la utilización de este medio " NaCl-HCO_3 " se podría obtener más información, tanto de otros iones, como de sustratos importantes, para los eventos involucrados en los procesos de la capacitación, así como del posible sitio de acción, del bicarbonato, relativo a estas funciones.

Por otra parte, las citocalacinas, un grupo de antibióticos

producidos por hongos, se ha mostrado que pueden afectar a procesos tales como: la fagocitosis (Davis y col., 1971), el transporte de glucosa (Estensen, 1972) y la secreción celular (Williams, 1972). Spudich en 1973 mostró que la citocalacina B inhibía la polimerización de la actina. Por la utilización de la citocalacina B, para dilucidar la posible participación de la actina en los procesos de la capacitación y de la reacción acrosomal del espermatozoide de cuyo, en este estudio, sin embargo, 50 $\mu\text{g/ml}$ (aprox. 100 μM) en el medio de incubación NaCl-Glu-HCO_3 , 10 veces una concentración de la droga que la cantidad que se conoce inhibe la adhesión mayor de las amibas (Raudin y Guerrent, 1981), no tuvo efecto sobre la capacitación ni sobre la expresión de la reacción acrosomal, pero sí, sobre la movilidad espermática. Estos resultados podrían explicarse de varias formas; por ejemplo: 1) que la actina descrita en los espermatozoides de los mamíferos no participara en los procesos de capacitación de reacción acrosomal 2) que la cantidad de citocalacina B usada en nuestros experimentos, no fuera la adecuada y 3) que la polimerización de la actina espermática no sea afectada por la citocalacina B. Esta observación estaría apoyada por lo comunicado por Sanger y Sanger en 1975, de que la citocalacina B no inhibe la polimerización de la actina, durante la formación del proceso acrosomal, en los espermatozoides de erizo de mar. Sin embargo, hay que recordar que la formación del proceso acrosomal o alguna estructura similar, no se ha detectado

en los espermatozoides de los mamíferos.

El efecto de la citocalacina B sobre la movilidad de los espermatozoides fue observado anteriormente por Peterson y Freund (1977); quienes además encontraron que la inhibición de la movilidad se debía a una inhibición del metabolismo por una disminución de la captación de la glucosa por la presencia de la citocalacina B (Peterson y cols., 1977). Con relación a la tubulina, Guisti y Mazzini en 1973 describieron, en el acrosoma de espermatozoides de invertebrados inferiores, microtúbulos constituidos por tubulinas. Se ha sugerido de que en los espermatozoides de los mamíferos, exista un sistema de microtúbulos lábiles y que por sus características no se hayan identificado. El papel que se les ha asignado a los microtúbulos, es el de mantener la forma acrosomal o además, basados en la distribución de la actividad proteolítica acrosomal, que parece coincidir con la distribución de los microtúbulos, el que éstos puedan participar durante la capacitación o durante la fertilización (Stambaugh y Smith, 1978). En nuestras incubaciones de espermatozoides por la presencia de 5 o 50 mM de colchicina, un inhibidor de la polimerización que además, despolimeriza a la tubulina "lábil", no pudimos observar algún efecto, ya fuera sobre la capacitación o sobre la expresión de la reacción acrosomal. Esto posiblemente debido a que los microtúbulos descritos en espermatozoides de los mamíferos no participan durante la capacitación o durante la reacción acrosomal o bien a que las concentraciones utilizadas de la droga no haya sido las adecuadas. Sin

embargo, pudimos observar que aunque el número de espermatozoides capacitados fue el mismo en ausencia como en la presencia de la colchicina, la cinética de aparición de espermatozoides sin acrosoma, no fue la misma cuando se compararon con los espermatozoides preincubados en NaCl-Glu-HCO₃ por 45 min y transferidos a MCM contra aquellos que se transfirieron a MCM que contenía 50 mM de la droga, lo que nos sugiere que, posiblemente la tubulina pudiera participar durante la expresión de la reacción acrosomal, permitiendo que ésta se realice de una forma controlada. Esta apreciación necesita evidentemente de estudios adicionales, en los que se valore el efecto de la colchicina a intervalos más cortos, para obtener una cinética completa de la pérdida del acrosoma.

El efecto sobre la movilidad espermática inducido por colchicina, se le puede atribuir a sus metabolitos, ya que se conoce que se pueden unir a las membranas (Rodking y col., 1984) y que pudieron alterar de alguna manera el transporte de sustratos, ya sea al interior celular o dentro de la mitocondria.

CONCLUSIONES

1. Los espermatozoides del cuyo preincubados a 37°C durante 35 min en solución de NaCl 0.154 M, no se capacitan, ya que al transferirlos al medio MCM expresan la reacción acrosomal, en un lapso de tiempo igual, a aquéllos que sólo se mantuvieron en MCM, Fig. 1
2. Es posible sugerir que los espermatozoides tratados durante 45 min a 37°C en NaCl-HCO₃ (HCO₃⁻, 11, 25 o 40 mM), alcanzan alguna(s) etapa(s) de la capacitación, ya que al transferirlos al MCM expresan la reacción acrosomal en forma más temprana, que aquéllos que sólo se incubaron en MCM.
3. Los espermatozoides mantenidos por tiempos prolongados, desde 80 min hasta 105 min, en NaCl-HCO₃ (11, 25 o 45 mM), se capacitan; ya que al transferirlos al medio MCM expresaron la reacción, dentro de los primeros 15 min de su transferencia. La concentración de bicarbonato 25 mM fue la que en estas condiciones mostró los mejores resultados, mejor movilidad de los espermatozoides y un mayor número de células con reacción acrosomal, cuando fueron transferidos al MCM, Fig. 5.
4. La adición de glucosa (Glu, 5.56 mM), al medio de preincubación NaCl-HCO₃ (11 o 25 mM), permite que la movilidad de los espermatozoides se mantenga y además capacitarse en sólo 45

min de preincubación ya que la expresión de la RA se presentó dentro de los primeros 15 min de haber sido transferidos al MCM, figuras 2 y 4.

5. El efecto del HCO_3 sobre la capacitación de los espermatozoides en el medio NaCl-G, no parece ser debida a su acción amortiguadora, ya que cuando se le substituyó por trietanolamina, el número de espermatozoides capacitados fue menor que el observado con HCO_3 , Fig. 3.
6. La glucosa, en presencia de HCO_3 o de trietanolamina, durante la preincubación les confiere a los espermatozoides un movimiento activo de vibración, aunque ligeramente más activo con HCO_3 que con trietanolamina.
7. La citocalacina a una concentración de 100 μM no parece tener algún efecto ni sobre la capacitación ni sobre la reacción acrosomal, ya que adicionada al medio de preincubación o al medio de transferencia, respectivamente, no produjo ningún efecto sobre la reacción acrosomal, valorada en ambos casos en MCM, figuras 6 y 7, pero sí negativamente sobre la movilidad.
8. La colchicina a dos concentraciones, 5 o 50 mM, no influye sobre la capacitación de los espermatozoides en el medio NaCl- HCO_3 -G, Fig. 8; pero sí negativamente sobre su movilidad y su efecto presentó una relación directa a la concentración de la droga.

9. En los espermatozoides capacitados en el medio $\text{NaCl-HCO}_3\text{-G}$, la colchicina a las concentraciones 5 o 50 mM sí pareció tener un efecto sobre la reacción acrosomal, en los primeros minutos de haber sido transferidos al medio MCM añadido de la droga, ya que la pérdida del acrosoma fue significativamente diferente ($P < 0.05$) de la mostrada por el control sin colchicina; pero, el efecto ya no fue aparente a los 15 min de la transferencia, Fig. 9. Esto sugiere que posiblemente la colchicina intervenga en la cinética de la reacción acrosomal.

- Abercombie, M., Heaysman, J.F.M. and Pegrum, S.M. 1971. The locomotion of fibroblast in culture. IV Electron microscopy of leading lamella. *Exp. Cell Res.* 67: 359-367.
- Allison, A.C. and Hartree, E.P. 1970. Lysosomal enzymes in the acrosome and their possible role in fertilization. *J. Reprod. Fert.* 21: 501-515.
- Austin, C.R. 1951. Observations on the penetration of sperm into the mammalian egg. *Aust. J. Sci. Res.* B4: 581-589.
- Austin, C.R. 1975. Membrane fusion events in fertilization. *J. Reprod. Fert.* 44: 155-166.
- Austin, C.R. and Bishop, M.W.H. 1958. Role of the rodent acrosome and perforation in fertilization. *Proc. R. Soc. Lond. D. Biol. Sci.* 149: 241-248.
- Bavister, B.D. 1980. Recent progress in the study of early events in mammalian fertilization. *Develop. Growth and Differ.* 22: 385-402.
- Bearer, E.L. and Friend, D.S. 1982. Modification of anionic-lipid domains preceding fusion in guinea pig sperm. *J. Cell Biol.* 92: 604-615.
- Bedford, J.M. 1970. Sperm capacitation and fertilization in mammals. *Biol. Reprod. (Suppl.)* 2: 128-158.
- Brackett, G. and Oliphant, B.C. 1975. Capacitation of mouse spermatozoa in media with elevated ionic strength and reversible decapacitation with epididymal extract. *Fert. Steril.* 24: 948-955.

- Chang, M.C. 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tube. *Nature* 168: 697-698.
- Clarke, G.N. and Yanagimachi, R. 1978. Actin in mammalian sperm heads. *J. Exptl. Zool.* 205: 125-131.
- Davis, A.T., Estensen, R.D. and Quie, P.G. 1971. Cytochalasin B: III Inhibition of human polymorphonuclear leukocyte phagocytosis (35535) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 137: 161-164.
- Estensen, R.D. and Plagemann, P.G. 1972. Cytochalasin B: Inhibitor of glucose and glucosamine transport. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 69: 1430-1431.
- Fawcett, D.W. 1975. The mammalian spermatozoon. Review article. *Dev. Biol.* 44: 394-436.
- Fernández, H.L., Hunees, F.C. and Davison, P.F. 1970. Studies on the mechanism of axoplasmic transport in the crayfish cord. *J. Neurol.* 1: 395-409.
- Fernández, H.L., Hunees, F.C. and Davison, P.F. 1970. Studies on the mechanism of axoplasmic transport in the crayfish cord. *J. Neurol.* 1: 395-409.
- Foley, C.W. and Williams, W.L. 1967. Effect of bicarbonate and oviduct fluid on respiration of spermatozoa. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 126: 634-637.
- Friend, D.S., Orce, L., Perrelet, A. and Yanagimachi, R. 1977. Membrane particle attending the acrosome reaction in guinea pig spermatozoa. *J. Cell Biol.* 74: 561-577.

- Garbers, D.L., First, N.L. and Lardy, H.A. 1973. Properties of adenosine 3',5'-monophosphate-depend protein kinasas isolated from bovine epididymal spermatozoa. *J. Biol. Chem.* 248: 875-879.
- Garbers, D.L. and Kopf, G.S. 1980. The regulation of spermatozoa by calcium and cyclic nucleotides. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 13: 251-307.
- Garbers, D.L., Tubb, J.D. and Hyne, R.V. 1982. A requirement of bicarbonate for Ca^{2+} induced elevations of cyclic AMP in guinea pig spermatozoa. *J. Biol. Chem.* 257: 8980-8984.
- Gordon, M. 1973. Localization of phosphatase activity on the plasma of the mammalian sperm head. *J. Exp. Zool.* 185: 110-120.
- Green, D.P.L. 1978. The mechanism of the acrosome reaction. *Development in mammalian*. V-3 (Ed.) M.H. Johnson. North-Holland. Amsterdam. New York, Oxford 64-81
- Giusti, F. and Mazzini, R. 1973. The spermatozoon of *truncatella* (S. Str.) *suboylindrica* (Gastropoda prosobranchia). *Monitore Zool. Ital.* 7: 181-201.
- Hammersted, R.H. and Lardy, H.A. 1983. The effect of sustrate cycling on the ATP yield sperm glycolysis. *J. Biol. Chem.* 258: 8759-8768.
- Hartree, A. 1977. Spermatozoa, eggs and proteinases. *Biochem. Soc. Tran Sco.* 5: 375-394.

- Huacuja, L., Delgado, N.M., Merchant, H., Pancardo, P.M. and Rosado, A. 1977. Cyclic AMP-induced incorporation of $^{33}\text{P}_i$ into human spermatozoa membrane components. *Biol. Reprod.* 17: 89-96.
- Hyne, R.V. and Garbers, P.L. 1981. Requirement of serum factors for capacitation and the acrosome reaction of guinea pig spermatozoon in buffered medium below pH 7.8. *Biol. Reprod.* 24: 257-266.
- Iritani, A., Gomes, W.R. and Van Demark, N.L. 1969. The effect of whole, dialyzed and heated female genital tract fluids on respiration of rabbit and ram spermatozoa. *Biol. Reprod.* 1: 77-82.
- Johnson, M.H. 1975. The macromolecular organization of membranes and its bearing on events leading up to fertilization. *J. Reprod. Fert.* 44: 167-184.
- Johnson, L.L., Katz, D.F. and Overstreet, J.W. 1981. The movement characteristics of rabbit spermatozoa before and after activation. *Gamete Res.* 4: 275-282.
- McDaniel, M.L., Liang, A.M. and Willian, J.L. 1971. Effect of CO_2 concentrations on intermediates of Embden-Myerhof pathway and citic acid cycli in isolated rat liver. *J. Biol. Chem.* 246: 4813-4817.
- Meizel, S. The mammalian sperm acrosome reaction. A biochemical approach. *Development in Mammals. V-3 (Ed.) M.H. Johnson.* North-Holland. Amsterdam. New York. Oxford 1978. 1-64.

- Mohri, H. 1976. The function of tubulin in motile systems. *Biochemica et Biophysica Acta* 456: 85-127.
- Mújica, A. and Valdez, R.M.A. 1983. On the role of glucose in capacitation and acrosome reaction of guinea pig sperm. *Gamete Res.* 8: 335-344.
- Murdoch, R.N. and Davis, W.D. 1978. Effects of bicarbonate on the respiration and glycolytic activity of boar spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.* 31: 385-394.
- Murdoch, R.N. and White, I.G. 1968. Studies of the metabolism of human spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 16: 351-361.
- Murdoch, R.N. and White, I.G. 1968a. The influence of the female genital tract on the metabolism of rabbit spermatozoa. I. Direct effect of tubal and uterine fluids, bicarbonate and other factors. *Aust. J. Biol. Sci.* 21: 961-972.
- Murdoch, R.N. and White, I.G. 1968b. The influence of the female genital tract on the metabolism of rabbit spermatozoa. II. Effect of storage with glucose, lactate, bicarbonate and female genital tract fluids. *Aust. J. Biol. Sci.* 21: 973-980.
- Murdoch, R.N. and White, I.G. 1971. Studies of the stimulating effect of bicarbonate on the metabolism of ram spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 25: 231-242.
- Oliphant, G. and Brackett, B.G. 1973. Immunological assessment of surface changes of rabbit sperm undergoing capacitation. *Biol. Reprod.* 9: 404-414.

- O'Rand, M.G. 1977. Restriction of a sperm surface antigens motility during capacitation. *Dev. Biol.* 55: 260-270.
- O'Shea, T. and Wales, R.G. 1967. Fixation of carbon dioxide by ram spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 14: 333-338.
- Peterson, R.N., Bundman, D. and Freund, M. 1977. Binding of cytochalasin B to hexose transport sites on human spermatozoa and inhibition of binding by purines. *Biol. Reprod.* 17: 198-208.
- Peterson, R.N. and Freund, M. 1977. Reversible inhibition of the motility of human spermatozoa by cytochalasin B. *Fertil. Steril.* 28: 257-261.
- Peterson, R., Russell, L., Bundman, D. and Freund, M. 1978. Presence of microfilaments and tubular structures in boar spermatozoa after chemically inducing the acrosome reaction. *Biol. Reprod.* 19: 459-466.
- Ravdin, J.I. and Guerrant, R.L. 1981. Role of adherence in cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. *Amer. Soc. Clin. Invest.* 68: 1305-1313.
- Rogers, B.J. 1978. Mammalian sperm capacitation and fertilization in vitro: a critique of methodology. *Gamete Res.* 1: 165-223.
- Rogers, B.J., Chang, L. and Yanagimachi, R. 1979. Glucose effect on respiration: Possible mechanisms for capacitation in guinea pig spermatozoa. *J. Exp. Zool.* 207: 107-112.

- Rogers, B.J. and Morton, B. 1973. ATP levels in Hamster spermatozoa during capacitation in vitro. Biol. Reprod. 9: 361-369.
- Rogers, B.J., Nevo, M. and Yanagimachi, R. 1977. Inhibitions of hamster acrosome reaction and fertilization by oligomycin, antimycin A and rotenona. J. Exp. Zool. 199: 129-136.
- Rogers, B.J. and Yanagimachi, R. 1975. Retardation of guinea pig acrosome reaction by glucose: The possible importance of piruvate and lactate metabolism in capacitation and acrosome reaction. Biol. Reprod. 13: 568-575.
- Sanger, J.W. and Sanger, J.M. 1975. Polymerization of sperm actin in the presence of cytochalasin B. J. Exp. Zool. 193: 441-447.
- Santos-Sachi, J. and Gordon, M. 1982. The effect of ATP depletion upon the acrosome reaction in guinea pig sperm. J. Androl. 3: 108-112.
- Singer, I.I. 1979. Microfilament bundles and the control of pinocytotic vesicle distribution at the surface of normal and transformed fibroblasts. Exp. Cell.Res. 122: 251-264.
- Singh, J.P., Babcock, D.F. and Lardy, H.A. 1978. Increased calcium ion influx is a component of capacitation of spermatozoa. Biochem. 172: 549-556.
- Stambaugh, R. and Smith, M. 1978. Tubulin and microtubule-like structures in mammalian acrosome. J. Exp. Zool. 203: 135-141.

- Stone, R.I., Foley, C.N., Thorne, J.G. and Huber, T.L. 1973. Effect of oviductal fluids on oxidative phosphorylation in spermatozoa. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 142: 64-67.
- Spudich, J.A. 1972. Cytochalasin B, its interaction with actin and actomyosin muscle. *Proc. Nat. Acad. Sci. US* 69: 442.
- Talbot, P. and Kleve, M.G. 1978. Hamster sperm cross react with antiactin. *J. Exp. Zool.* 204: 131-136.
- Tamblyn, T.M. 1980. Identification of actin in boar epidymal spermatozoa. *Biol. Reprod.* 22: 727-734.
- Tilney, L.G., Hatano, S., Ishikawa, H. and Mooseker, M. 1973. The polymerization of actin: Its role in the generation of the acrosomal processes of certain echinoderm sperm. *J. Cell Biol.* 59: 109-126.
- Váldez, R.M.A. 1981. Síntesis de proteínas por las mitocondrias de espermatozoides capacitados de cuyo. Tesis de lic. Univ. Aut. Nuevo León. Fac. Ciencias Biológicas, México. 17-20
- Virtanen, I., Paasivvo, R. and Lehto, V.P. 1984. Cytoskeletal organization of human spermatozoon. *J. Submicrosc. Cyto.* 16: 137.
- Wales, R.G. and Murdoch, R.N. 1971. Factors influencing the response of ram spermatozoa to bicarbonate and carbon dioxide. *Aust. J. Biol. Sci.* 24: 345-354.
- Williams, J.A. 1971. Cytochalasin B. Inhibits thyroid secretion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44: 422-424.

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

Rodkind, M., Mourelle, M. and Kershenobich, D. Antinflammatory and antifibrogenic activities of colchicine: Treatment of liver cirrhosis. *Myelofibrosis and biology of connective tissue.* (Ed.) R. Alin. New York, 1984. 475-489.