



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

"IZTACALA"

**CONTENIDO DE GLUCOSA-6-FOSFATO EN LOS ESPERMA-
TOZOIDES DEL CUYO (*Cavia sp.*), Y SU RELACION CON
LA DURACION DE SU MOVILIDAD Y CON EL
TIEMPO EN QUE SE CAPACITAN**

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
MARTIN PALOMAR MORALES

1 9 8 6

LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MEXICO



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.

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N., en el laboratorio de la Dra. Adela Mújica de Hernández y bajo su dirección. Durante siete meses se recibió un apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

DIOS MIO:

No es necesario escribir para decirte lo que siento, pues tú ves en mi alma. Sin embargo, quiero poner aquí mi agradecimiento por la vida que me diste; por la Fé en tí; por la Esperanza en el bien; por el Amor de los que me rodean; por ser quien soy, por Todo lo que me das,
Gracias, Señor

"Aplica tu corazón a la instrucción,
y tus oídos a las palabras sabias"

Prov 23, 12

Por su bondad, su amor y su confianza,

A MIS PADRES

Ernesto y Engracia

A MIS HERMANOS

Ladislao

Evangelina

Ignacio

Miguel Angel

Ernesto

Con todo mi afecto, mi respeto y mi gratitud
a la Doctora Adela Mújica de Hernández, por
su asesoramiento, apoyo y paciencia durante
casi dos años

A Leonor C. Fierros Sela, por la mecanografía
de este trabajo

A mis compañeros de laboratorio:

Francisco

Jorge

José de Jesús

Leticia

María Begoña

Ricardo

A la Srta. Q.F.B. Artemisa Posada y en
general a todo el personal de S.C.A.D.M.A.
del CINVESTAV-IPN por permitirme el acceso
al espectrofotofluorómetro

A mis compañeros del Plan Modular; a los
Profesores que lo han hecho posible

A mis amigos, con cariño especial a Guillermina,
Rosa María, Marfa Guadalupe, Luly, Jesús, Manuel
Ignacio y Nazario

INDICE

	Pág.
Lista de abreviaturas	1
Resumen	2
Introducción	5
La reproducción en los mamíferos	5
La fertilización en los mamíferos	6
Capacitación	7
Reacción acrosomal	8
Antecedentes	10
Metabolismo del espermatozoide	10
I. En el epidídimo	10
II. En el semen	10
III. En el tracto reproductor femenino	11
IV. En la capacitación <i>in vitro</i> del espermatozoide	11
Efecto del bicarbonato sobre la capacitación y el metabolismo espermáticos	13
Objetivos	14
Material y Métodos	15
Reactivos	15
Medios de lavado y de incubación	15
Obtención de los espermatozoides	15
Selección de las muestras	16
Lavado de los espermatozoides	17

Determinación de la concentración espermática	17
Determinación de la duración de la movilidad espermática	18
Determinación del tiempo y la cinética de aparición de la RA	18
Determinación de las concentraciones de los metabolitos intraespermáticos	19
A. Extracción de los metabolitos	19
B. Determinación de la G6P	21
C. Determinación de la ATP	22
D. Determinación de la glucosa libre	23
Determinación de glucosa y G6P en el plasma epididimal	24
Determinación del número espermático en base a su densidad óptica	24
Análisis estadístico	26
Resultados	29
Efecto del tipo y número de lavados sobre la concentración intraespermática de G6P	29
Glucosa libre en los espermatozoides de los conductos deferentes y en el plasma epididimal	31
Efecto de la extracción de los espermatozoides en un medio con glucosa sobre la RA	33
Efecto de la concentración de G6P intraespermática sobre la movilidad y la capacitación	35

Efecto de la incubación en MCM sobre la concentración de G6P y la capacitación espermática	37
Efecto de los lavados en la concentración intraespermática del ATP	39
Concentración de ATP intraespermático y su relación con el tiempo de capacitación de los espermatozoides ...	40
Efecto del bicarbonato sobre las concentraciones de G6P y ATP, y sobre la movilidad y la capacitación espermáticas	42
a) Sobre las concentraciones de G6P y de ATP	42
b) Sobre la movilidad	45
c) Sobre la capacitación	45
i) Durante una preincubación de 5 min	45
ii) Durante una preincubación de 35 min	46
Discusión	52
Efecto de los lavados sobre el nivel de la G6P y la relación de ésta con la capacitación y la expresión de la RA	52
Efecto de los niveles intraespermáticos de ATP sobre la capacitación y la RA	55
Efecto del bicarbonato sobre la movilidad, el metabolismo y la capacitación espermáticas	56
Conclusiones	61
Referencias	63

Lista de abreviaturas usadas en el texto

AMP _c	3'5'-fosfato cíclico de adenosina ó AMP cíclico
ATP	trifosfato de adenosina
DNA	ácido desoxirribonucleico
2dG	2-desoxiglucosa
DTT	ditiotreitol
F6P	fructosa-6-fosfato
G6P	glucosa-6-fosfato
G6PDH	deshidrogenasa de la glucosa-6-fosfato
HK	hexocinasa
MCM	medio mínimo capacitante
NADP, NADPH	fosfato del dinucleótido de nicotinamida y adenosina, formas oxidada y reducida, respectivamente
PBS	solución salina amortiguada con fosfatos
RA	reacción acrosomal
SDS	dodecil-sulfato de sodio
Trizma	tris (hidroximetil) aminometano
Tritón X-100	un detergente no iónico
x g	número de veces la gravedad

RESUMEN

En este trabajo se trató de encontrar alguna relación entre la concentración de glucosa-6-fosfato (G6P) ó del ATP, que presentaban los espermatozoides lavados provenientes de los conductos deferentes del cuyo y la duración de la movilidad, el tiempo de capacitación y la cinética de presentación de la reacción acrosomal (RA).

Se seleccionó como medio de obtención y de lavado de las células una solución de NaCl 154 mM (solución salina), la cual se ha usado en innumerables trabajos para la obtención y/o incubación de diversos tipos celulares.

Los espermatozoides recién obtenidos de los conductos deferentes mostraron un alto contenido de ATP, y un bajo contenido de G6P, Concomitante con los lavados, el nucleótido mostró una disminución de su concentración, mientras que la de la hexosafosfato aumentó.

Los espermatozoides, luego de ser lavados, se incubaron en tres medios distintos: en la solución salina, en esta solución suplementada con bicarbonato (25 mM) y en el medio mínimo capacitante (MCM), en el cual los espermatozoides se capacitan y expresan la RA (Barros y cols, 1973).

Se observó, además, que los espermatozoides no lavados, preincubados en la solución salina de extracción, así como los obtenidos en salina suplementada con glucosa (5.56 mM) y lavados

mostraron un contenido de G6P mayor al observado en los espermatozoides lavados. En ambas condiciones, en las que el contenido de G6P fue más alto, el tiempo al que ocurrió la capacitación en MCM se retardó, y el número de espermatozoides que presentaron RA fue menor al de sus controles correspondientes.

En los espermatozoides no se halló glucosa libre, pero el azúcar sí fue detectado en el plasma epididimal, en cantidades más elevadas a las previamente reportadas para otras especies.

No se encontró que la concentración de la G6P ó la de ATP de los gametos lavados guarde una relación lineal, ni con el tiempo que los espermatozoides se mantuvieron móviles, ni con el de su capacitación, ni tampoco con la cinética de aparición de la RA durante la incubación de los espermatozoides en MCM.

Cuando las células lavadas se preincubaron 5 min en presencia de bicarbonato, las concentraciones del ATP y de la G6P fueron más altas en comparación a las mostradas por los espermatozoides preincubados en salina simple. Cuando la preincubación se prolongó a 35 min, la concentración, tanto de la G6P como la de ATP en los gametos incubados en presencia del bicarbonato, fue mayor a la mostrada por los espermatozoides incubados en ausencia del ion. Dicha preincubación en presencia de bicarbonato había sido comunicada por Moreno en 1984 como capacitante, lo que fue confirmado en este trabajo. También se corroboró que 35 min de incubación en salina no es suficiente para capacitar a los gametos. Cuando se relacionaron el ATP y la G6P espermáticos contra el

por ciento de gametos con RA, hubo una tendencia a mostrar un número mayor de esta, conforme eran más altas las concentraciones de los metabolitos.

INTRODUCCION

La reproducción en los mamíferos

Estos organismos se reproducen en forma sexual, o sea, en este proceso, participan los individuos de ambos sexos en forma complementaria. Un individuo de cada sexo aporta uno de sus gametos ó células germinales, las que, al unirse originan un huevo ó cigoto, el cual, posteriormente se desarrollará y diferenciará para constituir un nuevo organismo de la misma especie, con características genéticas similares a las de sus progenitores.

Los gametos se forman a partir de sus células precursoras mediante la gametogénesis, proceso que involucra una división reductiva, denominada meiosis, en dos etapas, la meiosis I y la meiosis II. Esta división resulta en la reducción del número cromosómico a la mitad, y un intercambio de material genético. La gametogénesis se llama ovogénesis cuando se refiere a la producción de gametos femeninos u óvulos, y espermatogénesis en el caso de los masculinos o espermatozoides.

La espermatogénesis ocurre en los testículos, en ellos las espermatogonias, que se diferenciarán a espermatozoides, se hallan como una población de número reducido al momento del nacimiento del individuo. Esta población tiene divisiones mitóticas poco frecuentes, hasta que, bajo control hormonal a partir de la pubertad, y durante toda la vida fértil del individuo, proliferan por mitosis continua en forma permanente, y una parte de la

población detiene su proliferación mitótica y pasa a la de meiosis. Al final de este proceso las células resultantes ó espermáticas, de morfología similar a las células somáticas, sufren un cambio radical durante la espermiogénesis, proceso en el cual adquieren la morfología típica del espermatozoide característico de la especie.

Al término de la espermiogénesis, el espermatozoide formado se halla unido a la célula nodriza o de Sertoli, de la cual se separa y es llevado pasivamente hacia la luz de los túbulos seminíferos y de ahí al epidídimo, para posteriormente pasar a los conductos deferentes, donde permanece hasta la eyaculación. Durante su paso a través del epidídimo el espermatozoide sufre un proceso de maduración.

La fertilización en los mamíferos

A diferencia de lo que ocurre en invertebrados marinos y algunos peces, la interacción de los gametos de los mamíferos se lleva a cabo dentro del tracto reproductor de la hembra. Esta es una de las razones por la cual en el conocimiento de la biología de la reproducción en los mamíferos no se ha logrado avanzar a la misma velocidad que como ha sucedido en el estudio del fenómeno en los invertebrados marinos, como, por ejemplo, en el erizo de mar. Otra razón es que los gametos de éste y de otros invertebrados marinos se obtienen en gran número y de forma relativamente rápida, fácil y económica, mientras que en los mamíferos sobre todo el número de gametos obtenibles es limitado.

A pesar de las limitantes señaladas, el estudio de la reproducción de los mamíferos ha avanzado; se han logrado descubrir y desentrañar, en parte, dos fenómenos que deben ocurrirle al espermatozoide para que pueda fecundar al óvulo: la capacitación y la reacción acrosomal (RA).

Capacitación

La capacitación fue descubierta en 1951 en forma simultánea e independiente por Austin y Chang. Su duración es variable según la especie, y se ha descrito que ocurre únicamente en los mamíferos. El fenómeno y su significado no se conocen en su totalidad, pero su objetivo parece ser el de que el espermatozoide sufra la RA. En este trabajo se adoptó la definición de la capacitación sugerido por Bedford (1970), quien la describe como el conjunto de cambios que el espermatozoide debe sufrir para poder presentar la RA, de forma natural en el tracto reproductor femenino ó por incubaciones *in vitro*.

Se ha observado que los cambios relacionados con la capacitación son de varios tipos: 1) Cambios a nivel de la membrana plasmática: algunos antígenos de la superficie celular externa son alterados ó perdidos (Oliphant y Brackett, 1973); las partículas intramembranales se reorganizan, formando áreas ricas en fosfolípidos y carentes de estas partículas (Friend y col, 1977); los fosfolípidos de la membrana sufren una metilación incrementada (Llanos y Meizel, 1983); el nivel de fosfolípidos membranales

aumenta (Davis y col, 1979); hay una pérdida de colesterol, lo que causa una disminución en la relación colesterol: fosfolípidos (Davis, 1984); se modifican componentes del tipo de los carbohidratos en la región acrosomal (Kinsley y Koehler, 1978); la permeabilidad al calcio se incrementa (Yanagimachi y Usui, 1974; Singh y col, 1978). 2) Cambios en el metabolismo: el contacto con los fluidos del tracto reproductor femenino causa en el espermatozoide un incremento en su metabolismo (Chang, 1957); la respiración y el índice glucolítico se incrementan (Rogers y col, 1979); la concentración intracelular del ATP disminuye (Santos-Sacchi y Gordon, 1982); el nivel de nucleótidos cíclicos se eleva (Garbers y Kopf, 1980). 3) Hiperactivación de la movilidad del espermatozoide durante las incubaciones capacitantes *in vitro* (Yanagimachi, 1969), así como por su contacto durante su viaje, con los fluidos del tracto reproductor femenino (Lambert y cols, 1985).

Reacción acrosomal

Este evento fue considerado antes como parte de la capacitación, y posteriormente, como un evento separado y resultante de ella. La RA fue observada primeramente por Austin y Bishop en 1958, y se sabe que depende de Ca^{2+} exógeno (Yanagimachi y Usui, 1974; Singh y col, 1978; Talbot y col, 1979). La RA se inicia por una fusión, en múltiples sitios, entre la membrana plasmática y la acrosomal externa, dando origen a vesículas mixtas, la pérdida de

membranas, la exposición de la membrana interna del acrosoma, y la liberación del contenido acrosomal, constituido principalmente por enzimas hidrolíticas: acrosina (proteasa del tipo de la tripsina), hialuronidasa, fosfatasa ácida, β -glucuronidasa, β -glucosidasa, β -galactosidasa, β -N-acetilgalactosaminidasa y β -N-acetilglucosaminidasa entre otras (McRorie y Williams, 1974; Mann y Lutwack-Mann, 1975; Rogers y Yanagimachi, 1975a; Primakoff y col, 1980; Mack y col, 1983)

ANTECEDENTES

Metabolismo del espermatozoide

I. En el epidídimo

Los espermatozoides al abandonar el testículo entran al epidídimo, un órgano tubular muy largo y altamente enrollado, y viajan a lo largo del mismo, donde completan su maduración. El tiempo que permanecen en este órgano varía con la especie, pero no difiere mucho entre ellas, en promedio su tránsito dura 10 días. Durante su permanencia en el epidídimo, los espermatozoides obtienen la energía que requieren de la ruptura de sus propios lípidos, y subsiguiente beta oxidación de ácidos grasos (Hartree y Mann, 1959; Mann, 1960; Inskip y Hammerstedt, 1982; Lardy y Phillips, 1941), convirtiendo éstos a unidades de dos carbonos ó acetilos, las que pueden almacenarse en la mitocondria gracias a la carnitina y a la acetil-carnitina transferasa espermáticas (Casillas, 1972) o ser oxidadas hasta CO_2 y H_2O con producción de ATP.

II. En el semen

El gameto masculino al ser eyaculado sale suspendido en el plasma seminal, muy rico en fructosa, carbohidrato secretado principalmente por las glándulas seminales (Mann, 1946, 1949). Este substrato es captado por el espermatozoide y metabolizado a lactato en condiciones anaeróbicas (Peterson y Freund, 1969; Mann, 1945, 1946, 1949). Sin embargo, en incubaciones tanto

anaeróbicas como aeróbicas, *in vitro*, el espermatozoide eyaculado capta y metaboliza a la glucosa a mayor velocidad que a la fructosa, es decir, la glucosa es el substrato preferente como fuente energética de los espermatozoides de los mamíferos, válida también en comparación con substratos oxidables como el lactato y el piruvato (Lardy y Phillips, 1941; Hammerstedt y Lardy, 1983).

III. En el tracto reproductor femenino

Cuando hay apareamiento sexual, el espermatozoide se ve expuesto a los diferentes fluidos del tracto reproductor femenino, donde la glucosa, el substrato preferente de los espermatozoides, es un constituyente normal, así como el lactato y el piruvato (Murdoch y White, 1968b). Se ha comunicado que los fluidos mencionados estimulan el metabolismo del espermatozoide, así se ha descrito un incremento en la respiración y en el metabolismo de los carbohidratos. Este efecto ha sido atribuido al HCO_3^- de los fluidos (Murdoch y White, 1968a, b). El aumento del metabolismo del espermatozoide es todavía mayor, cuando el espermatozoide ha permanecido por un tiempo más prolongado en el tracto genital femenino, o en incubaciones capacitantes *in vitro*, como se describe a continuación.

IV. En la capacitación *in vitro* del espermatozoide del cuyo

Se sabe que el metabolismo del piruvato y lactato permite la capacitación temprana del espermatozoide del cuyo, ya que la RA se presenta a partir de la hora de incubación, siempre y cuando en el medio se halle el calcio. Cuando los espermatozoides son incubados

en el medio de Tyrode, con glucosa como sustrato, la RA se presenta después de una hora de iniciada la incubación (Yanagimachi y Usui, 1974), y cuando la glucosa se añade a este medio (que permite la capacitación de los espermatozoides en una hora) la aparición de la RA se retarda por una hora más (Rogers y Yanagimachi, 1975b). Este efecto de la glucosa se atribuyó al efecto Crabtree que presentan los espermatozoides (Rogers y cols, 1979), efecto que se describe como una inhibición del consumo de oxígeno por la presencia de glucosa o de hexosas fosforilables (Koobs, 1972).

La explicación que propusieron Rogers y colaboradores sobre el efecto de la glucosa en el retardo de la aparición de la RA, fue de que la capacitación era retardada, y por lo tanto, la aparición de la RA. Posteriormente fue mostrado que la glucosa como único sustrato exógeno, permitía la capacitación temprana del espermatozoide del cuyo (Mújica y Valdés-Ruiz, 1983). Estos autores sugirieron además, que el nivel del primer intermediario del metabolismo glucolítico, la glucosa-6-fosfato (G6P) pudiera ser el que determinara la expresión de la RA en los espermatozoides capacitados.

Por otra parte, Hyne y Edwards (1985) proponen que la 2-desoxiglucosa inhibe la RA no por carencia de metabolitos endógenos, sino por la acumulación de 2-desoxiglucosa-6-fosfato y el abatimiento de la concentración del ATP, aunque también se ha propuesto que concentraciones muy bajas de ATP pueden soportar la capacitación (Rogers y Morton, 1973). Además, Inskip y

Hammerstedt (1985) observaron que existe una síntesis constante del nucleótido a partir de los metabolitos endógenos, ya sea en presencia ó ausencia de sustratos exógenos (glucosa, fructosa ó lactato).

Efecto del bicarbonato sobre la capacitación y el metabolismo espermáticos

Se ha descrito, que en el espermatozoide, que entra en contacto con los fluidos del tracto reproductor femenino, se incrementan su movilidad (Lambert y col, 1985) y su metabolismo (Chang, 1957). Estos fluidos son ricos en bicarbonato, ion al que se le han atribuido estos efectos (Foley y Williams, 1967; Murdoch y White, 1968a, b).

En incubaciones *in vitro* se ha visto que el bicarbonato y el calcio, en presencia ó ausencia de sustratos exógenos causan una elevación del contenido intraespermático del AMP_C (Garbers y col, 1984), efecto que no es producido por dichos iones por separado. Además, Hyne (1984) observó que la elevación del ATP_C se vió estimulada por inhibidores de la fosfodiesterasa en presencia del bicarbonato, sodio y calcio, y lo atribuyó a un efecto del bicarbonato sobre la $Na^+, K^+ - ATP'asa$. También se ha comunicado que el bicarbonato y los inhibidores de la fosfodiesterasa del AMP_C causan una alta movilidad del espermatozoide, y lo atribuyen a un aumento del AMP_C intracelular (Vijayaraghayan y cols, 1985).

En base a los antecedentes mencionados, en este trabajo nos

planteamos los siguientes objetivos:

Objetivos Generales

- a. Cuantificar el contenido inicial de G6P en los espermatozoides recién obtenidos de los conductos deferentes del cuyo
- b. Determinar si existe una relación entre el contenido intraespermático de G6P y el tiempo que permanecen móviles los espermatozoides, así como con el tiempo de aparición de la RA, esto último como valoración de la capacitación

Objetivos Particulares

- a. Discernir si hay un cambio del contenido endógeno de G6P en relación con el número de lavados a que serán sometidos los espermatozoides
- b. Valorar si existe una relación entre el tipo de lavado de los espermatozoides, con el tiempo de aparición de la RA
- c. Determinar si existe relación entre el contenido de G6P inicial y el número de espermatozoides con RA, durante la transferencia de espermatozoides incubados por tiempo fijo

MATERIAL Y METODOS

Reactivos

Los reactivos usados en este trabajo fueron todos de grado analítico y se obtuvieron de las siguientes casas comerciales: nembutal (pentobarbital sódico) de Smith Kline Norden de México; ácido láctico, formaldehído, dextrosa (glucosa), K_2CO_3 , NaCl, $MgCl_2$, KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 y $NaHCO_3$ de J.T. Baker; ácido perclórico ($HClO_4$) de Merck Darmstadt: piruvato de sodio, trietanolamina, ATP, G6P, DTT, Trizma, G6PDH (grado V de levadura de pan) y HK (grado V de levadura) de Sigma Chemical Co; Tritón X-100 y SDS de BDH Chemical Ltd.

Medios de lavado y de incubación

Las soluciones utilizadas para el lavado de los espermatozoides fueron: a) salina (NaCl, 154 mM), b) salina-glucosa (NaCl, 134.88 mM; glucosa, 11.12 mM). Los medios de incubación empleados fueron los siguientes: a) solución salina, b) salina-bicarbonato (NaCl 129 mM, $NaHCO_3$ 25 mM, pH 7.8), c) medio mínimo de cultivo (MCM: NaCl, 105 mM; $NaHCO_3$, 25 mm; $CaCl_2$, 1.71 mM; piruvato de sódio, 0.5 mM; ácido láctico, 20 mM; pH 7.8; Barros y cols 1973).

Obtención de los espermatozoides

Se utilizaron cuyos (*Cavia sp.*) sanos, de 600 a 700 g de peso corporal, se les anestesió por inyección intraperitoneal de

pentobarbital sódico (50 mg/kg de peso). Ya anestesiados, se les rasuró la parte inferior del vientre y se les practicó una insición cefalopodal, a través de la cual se localizaron y extrajeron los testículos junto con los conductos deferentes. Estos fueron pinzados en el extremo cercano a su unión con la vesícula seminal, y por separado, cada conducto se ligó en el extremo pinzado. Acto seguido se colocaron en un matríz Erlenmeyer de 125 ml con solución salina a 37°C, en un baño de agua a la misma temperatura.

Después, los conductos deferentes se disecaron, procurando mantenerlos humedecidos con solución salina. Una vez limpios fueron separados del epidídimo y testículo, y en el extremo ligado se practicó una ligera insición con un bisturí, y por ella se introdujo una cánula adaptada a una jeringa con 2.0 ml de salina, expulsando los espermatozoides de los conductos al inyectarla, y colectándolos por el otro extremo en un tubo de ensayo de vidrio.

Selección de las muestras

De cada suspensión de células se tomó una pequeña gota que se colocó en una laminilla de vidrio sin cubreobjetos. Los espermatozoides se observaron al microscopio de luz (fotomicroscopio Carl Zeiss-Jena, modelo Docuval), y se valoraron la movilidad y la concentración espermática, así como el grado de contaminación por otro tipo de células. Sólo las muestras que presentaban buena movilidad, pocos espermatozoides inmóviles y muy poca contaminación por otro tipo celular (menor al 1%) fueron utilizadas.

Lavado de los espermatozoides

Las muestras seleccionadas se centrifugaron (centrífuga clínica Roto Uni II) a 600 x g durante 3-4 min. Los sobrenadantes se desecharon, y los paquetes celulares se reunieron y resuspendieron, utilizando para ello 1 ml de salina por célula provenientes de un conducto. De nuevo se centrifugó la mezcla en las mismas condiciones, y el sobrenadante fue desechado. La pastilla celular se resuspendió, mezclándola con 1 ml de salina por conducto. De esta suspensión se extrajo una muestra alícuota (0.05 ml) para el conteo celular, y el resto se dividió en porciones (según los medios de incubación a probar) que se sometieron a centrifugación. Cada paquete celular se resuspendió en el volumen adecuado de la solución a ensayar, a una concentración de 40×10^6 espermatozoides/ml.

Determinación de la concentración espermática

Una muestra alícuota (50 μ l) de los espermatozoides después del primer lavado se diluyó con 1 ml de Tritón X-100 al 1% en PBS (PBS: Solución salina amortiguada con fosfatos: Na_2HPO_4 , 5.68 mM; KH_2PO_4 , 4.26 mM; NaCl 132.44 mM pH 7.2). La suspensión se mezcló vigorosamente (Vórtex, Lab-Line Instruments Inc.), y una gota se colocó en una cámara de Neubauer. El número de espermatozoides presentes en 5 de los 25 cuadrantes para conteo de eritrocitos fue registrado, y multiplicado por 5 (superficie = 1 mm^2). La concentración espermática en la suspensión celular original se

estimó con la fórmula siguiente:

$$CE = \frac{N \times D \times 1000}{H}$$

donde:

CE = Espermatozoides en 1 ml

N = número de espermatozoides en 1 mm² de la cámara de Neubauer

D = dilución de la muestra

H = altura de la cámara de Neubauer = 0.1 mm

Determinación de la duración de la movilidad espermática

Cuando los espermatozoides se incubaron en solución salina 6 en salina-bicarbonato, para determinar el tiempo al que se inmovilizaban, una gota de la suspensión espermática se extraía cada 2 ó 3 min, y se observaba al microscopio de luz. La movilidad se clasificó de la siguiente manera: MB = casi todos móviles; B = entre 50 y 70% móviles; R = menos de la mitad móviles; I = inmóviles. Las observaciones se prolongaron hasta el momento en que las muestras carecieron de movilidad.

Determinación del tiempo y la cinética de aparición en la RA

Los espermatozoides lavados o preincubados, según se especifique en cada caso, fueron sometidos a una incubación en MCM. Durante la incubación en este medio se extrajo cada 4 a 6 min una pequeña gota que se colocó en un portaobjetos y subjetivamente se evaluó el tipo de movilidad como ondulante ó de

vibración, y si presentaban o no la RA. Al momento de observarse ésta por vez primera, se extraía una gota de la muestra en incubación, y se fijaba en formaldehído al 3% en PBS (muestra T₀) y la observación de la suspensión incubada se continuaba. Quince minutos después de ser fijada la primera gota, de la muestra incubada se obtenía otra gota, que era también fijada (muestra T₁₅)

La valoración del porcentaje de la RA se hacía antes de 24 horas de haber sido fijadas las muestras. Para ésto, una gota de cada muestra fijada se colocaba en una cámara de Neubauer, tomando a la cuadrícula como referencia, para contar los gametos que habían perdido el acrosoma y los que lo conservaban, procurando que el número total contado no fuera menor a 200 gametos. El porciento de RA se determinó con la fórmula:

$$\%RA = \frac{\text{Espermatozoides sin acrosoma}}{\text{Espermatozoides totales}} \times 100$$

La cinética de aparición se calculó sustrayendo el porciento de RA hallado al tiempo cero (RA_{T₀}) del porciento valorado a los 15 min (RA_{T₁₅}): Cinética de RA = RA_{T₁₅} - RA_{T₀}.

Determinación de las concentraciones de los metabolitos intraespermáticos

A. Extracción de los metabolitos

Para extraer los metabolitos intraespermáticos ATP, G6P y glucosa, se utilizó la técnica descrita por Maitra y Estabrook en 1964, modificada de la siguiente forma:

De la suspensión espermática apropiada se tomó 1.0 ml (40×10^6 células estimadas por conteo en la cámara de Neubauer), y se colocó en un tubo de centrifuga Eppendorf (capacidad nominal 1.5 ml). A continuación las muestras se centrifugaron a $600 \times g$ durante 3 min a temperatura ambiente. Del sobrenadante se descartaron 0.9 ml, y al remanente se le agregó 0.1 ml de $HClO_4$ al 20%, seguidos por 0.8 ml del mismo ácido al 10% (p/v). Después de cada adición las muestras se agitaron vigorosamente (vórtex) 5 seg, y se dejaron en baño de hielo. De aquí en adelante todos los pasos se efectuaron a $0-4^\circ C$. Luego de 60 min en frío, las muestras se centrifugaron a $5000 \times g$ durante 20 min, y se recuperó el sobrenadante ácido, que fue transferido de forma cuantitativa a un tubo de ensayo de vidrio de 5 ml, y se le neutralizó el pH con K_2CO_3 2 M, registrando el volumen utilizado de este reactivo. El precipitado, células rotas, fue usado para determinar el número de espermatozoides por su densidad óptica a 260 nm.

La muestra neutralizada se transfirió a un tubo de centrifuga Eppendorf y fue centrifugada a $5000 \times g$ durante 15 min a $0-4^\circ C$ para sedimentar el $KClO_4$ formado, y el sobrenadante se recuperó y transfirió a otro tubo Eppendorf, en el cual se almacenó a $-20^\circ C$ por un tiempo mayor a 12 horas, luego del cual se descongeló en un baño de agua a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a $5000 \times g$ durante 5 min a $4^\circ C$ para descartar algún residuo de $KClO_4$, y el sobrenadante se recuperó cuantitativamente y se colocó en un tubo de ensayo en baño de hielo, donde permaneció hasta el momento

en que se determinaron los metabolitos.

B. Determinación de G6P

Se realizó de acuerdo al método descrito por Maitra y Estabrook en 1964, que se basa en la oxidación de la G6P a 6-fosfogluconato por acción de la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PDH), enzima que utiliza como cofactor la forma oxidada del fosfato del dinucleótido de adenosina y nicotinamida (NADP^+), y rinde como coproducto, en forma estequiométrica, a la forma reducida del cofactor, al NADPH. Este, al excitarse a una longitud de onda de 340 nm produce una emisión luminosa, que tiene su máximo cerca de los 460 nm.

La mezcla de reacción consiste de (concentraciones finales dadas en mM): un amortiguador de trietanolamina, 20 a pH 7.6; KCl, 10; MgCl_2 , 2; NADP^+ , 2.5; la muestra por ensayar (volumen variable desde 0.5 hasta 1.5 ml) y agua suficiente para ajustar el volumen a 2.5 ml. La fluorescencia fue medida en un espectrofotofluorómetro Aminco-Bowman modelo 4-8202, a una longitud de onda de excitación de 340 nm y la de emisión a 462 nm. La fluorescencia basal se ajustó a cero, y la reacción se inició por la adición de 4 μg de G6PDH. La fluorescencia emitida se siguió cada minuto hasta su estabilización, que generalmente ocurrió a los 2 ó 3 min, y el cambio total se registró. De inmediato se construyó una curva interna, mediante dos adiciones sucesivas de una solución estándar de G6P, cada una de 1 nmol, y se esperó la

estabilización para registrar la fluorescencia luego de cada adición. La fluorescencia causada por la enzima se valoró mediante una segunda adición de ella.

La cantidad de la G6P en la muestra espermática se calculó en base a los cambios obtenidos con el estándar de G6P. Para calcular la G6P de las muestras analizadas se tomó en cuenta: el cambio en fluorescencia causada por la enzima (que se sustrajo del valor en conjunto con la muestra), las diluciones sufridas por la muestra valorada, tanto por la adición de la enzima como del estándar de G6P; el volumen del sobrenadante ácido; el del K_2CO_3 utilizado para neutralizarlo y el del sobrenadante en el cual se realizó la valoración; así como el número espermático. La concentración finalmente se expresó en nmoles en 100 millones de espermatozoides ($nmol/10^8$ espermatozoides).

C. Determinación del ATP

El ATP se extrajo como se indicó previamente, y se valoró en la misma muestra donde fue determinada la concentración de la G6P. La determinación se llevó a cabo modificando ligeramente el método descrito por Williamson y Corkey en 1969, basado en la fosforilación de la glucosa por el ATP de la muestra mediante la acción de la hexocinasa, con producción de ADP y G6P en forma estequiométrica. La reacción se acopló a la que es catalizada por la G6PDH, de forma que la G6P es convertida a 6-fosfogluconato, y el $NADP^+$ a NADPH, registrándose un nuevo incremento en la fluorescencia, que es equivalente a la concentración de ATP en la

muestra analizada.

Operacionalmente, la determinación del ATP se efectuó de la siguiente forma: sobre la mezcla en la cual se determinó la G6P se adicionaron 20 μg de HK (en agua), y se cuantificó el incremento en la fluorescencia. De inmediato se adicionó la glucosa a una concentración final de 4 mM, para iniciar la reacción, y se registró la fluorescencia cada minuto hasta la estabilización, que ocurrió generalmente a los 4 ó 5 min del inicio. En seguida se construyó una curva estándar mediante dos adiciones sucesivas de 1 nmol de ATP cada vez. La concentración del ATP en la muestra original fue calculada y expresada de forma similar a la de G6P, para lo cual se tomaron en cuenta las diluciones sufridas en la muestra por la adición de la enzima; la glucosa y el estándar de ATP; el volumen del sobrenadante ácido; el de K_2CO_3 utilizado para neutralizarlo; así como el número espermático. La concentración del ATP se expresó en nmoles/ 10^8 espermatozoides.

D. Determinación de glucosa libre

Se valoró también la glucosa libre, en algunos casos, en la misma muestra en la cual se había determinado la G6P. La cuantificación se basó en el método de Maitra y Estabrook (1964), cuyo fundamento es la conversión de glucosa a G6P, reacción dependiente del ATP, y catalizada por la HK. La G6P formada fue acto seguido convertida a 6-fosfogluconato por la G6PDH, y la formación estequiométrica del NADPH que se valoró, como ya se indicó previamente. La determinación se llevó a cabo de la

manera siguiente: una vez cuantificada la G6P de la muestra, se agregaron 20 μg de HK y se registró el aumento en fluorescencia. Con la adición de ATP a una concentración final de 4 mM se inició la cuantificación de glucosa y se registró nuevamente la fluorescencia hasta su estabilización. Inmediatamente después se construyó una curva estándar, por dos adiciones sucesivas de 1 nmol de glucosa cada vez, y se registraron los incrementos de fluorescencia. La concentración obtenida de glucosa fue corregida por el volumen de la muestra, por las diluciones que ésta sufrió y por el número espermático, como se describió para G6P y ATP, y su valor se reporta como nmoles/ 10^8 espermatozoides.

Determinación de glucosa y G6P en el plasma epididimal

El contenido de dos conductos deferentes fue extraído por presión y su volumen se cuantificó. Se agregó 1.0 ml de solución salina, y la muestra se centrifugó a 600 x g durante 3-4 min. Todo el sobrenadante fue extraído, el volumen se registró, y se le agregó HClO_4 al 50% para dar una concentración final de 10%. El procedimiento de extracción de metabolismo, así como la determinación de G6P y de glucosa se realizó en forma análoga a lo previamente descrito.

Determinación del número espermático en base a su densidad óptica

Para todos los ensayos, se realizó la determinación del número espermático con el fin de relacionar la concentración de los metabolitos con el número de espermatozoides de cada muestra.

Curva tipo. La curva de referencia se construyó como sigue: en suspensiones de espermatozoides lavados se estimó su concentración celular mediante 5 determinaciones en la cámara de Neubauer, y se tomó la media aritmética. De estas suspensiones, ya valoradas, se tomaron muestras alícuotas de volúmenes variables que contenían de 5 a 100 millones de gametos, y se colocaron en tubos de centrifuga Eppendorf, y cada muestra se llevó a un volumen de 1.0 ml con solución salina. Las muestras se centrifugaron a 600 x g durante 3 min, y del sobrenadante se desecharon 0.9 ml. Al remanente se le agregaron 0.1 ml de HClO_4 al 20% (p/v) y 0.8 ml del mismo ácido al 10%. Las muestras se agitaron vigorosamente (vórtex) 5 seg luego de cada adición del ácido y se incubaron en baño de hielo a 4°C durante 60 min. Al término de esta incubación se centrifugaron a 5000 x g durante 20 min a 4°C, y el sobrenadante ácido se extrajo. A los espermatozoides, en la pastilla celular, se les agregó 0.1 ml de DTT 45 mM en Trizma 200 mM, para la ruptura de puentes disulfuro (Cleland, 1964; Hernández-Montes y cols, 1973) y alcalinización de la muestra.

Los espermatozoides fueron disgregados con ayuda de un agitador de vidrio, el cual fue lavado, al retirarlo, con otros 0.1 ml de DTT en Trizma, que se recibieron sobre la muestra. Esta se incubó a temperatura ambiente durante 30 min, para permitir la acción del DTT. Al cabo de este tiempo, se agregaron 0.2 ml del detergente aniónico SDS al 1% en PBS y 0.2 ml de agua bidestilada. La muestra resultante, viscosa, fue sometida a una sonicación a 14

watts durante 30 seg para fluidificarla. De la suspensión resultante se tomaron 0.4 ml, y se mezclaron con 1.6 ml de PBS, y se leyó su densidad óptica (DO) a 260 nm (espectrofotómetro Gilford, modelo 250), contra un blanco de reactivos, con el cual se ajustó la densidad a una lectura de 0.0.

Los valores de la densidad óptica a 260 nm de las muestras se graficaron contra el número de espermatozoides en millones, y se analizaron por regresión lineal simple (Daniel, 1979). En la figura 1 se muestra la gráfica obtenida.

Estimación del número de espermatozoides en las muestras. La pastilla espermática recuperada del tratamiento ácido (ver extracción de los metabolitos) se trató con DTT en Trizma, y SDS como se describió en el inciso anterior. Después de ser sonicada, la muestra fue mezclada con PBS y se leyó su densidad óptica a 260 nm contra un blanco de reactivos, y el valor obtenido se interpoló en la curva patrón para obtener el número espermático.

Análisis estadístico

En los experimentos en los que se investigó el efecto de la concentración intraespermática de G6P ó de ATP sobre la duración de la movilidad, el tiempo de capacitación o la cinética de la RA, se utilizó el análisis de regresión lineal simple (Daniel, 1977). La variable independiente (X) correspondió a las concentraciones de los metabolitos, y la variable dependiente (Y) a la duración de la movilidad, ó al tiempo de aparición de la RA, o a la cinética de

aparición de ésta.

Se realizaron pruebas "t" de Student con el fin de establecer diferencias entre: a) la concentración de G6P o la de ATP causada por el número de lavados, el tipo de lavado, o la solución empleada para la incubación; b) la duración de la movilidad espermática en relación al medio de incubación usado; c) el inicio o la cinética de la RA y su relación con el tipo de lavado al que se sometieron las células.

Cuando el número de experimentos a comparar era igual (ya fuera de muestras paralelas o de experimentos distintos) se utilizó la prueba "t" de Student para datos pareados; en caso de número desigual de experimentos, se utilizó la prueba "t" de Student para datos no pareados. Para ambos casos, se obtuvo el valor de significancia utilizando sólo una cola de la curva (Daniel, 1979).

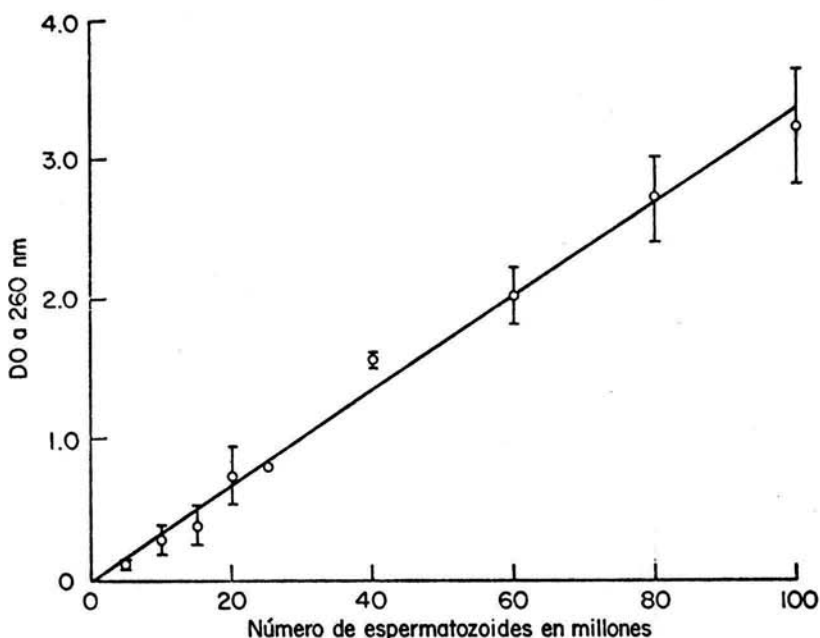


Fig. 1. Correlación entre la concentración espermática y su densidad óptica a 260 nm. Los espermatozoides (3 experimentos) se lavaron por el método habitual en solución salina como se describe en Métodos, y se distribuyeron en alícuotas de volumen variable, con número espermático de 5 a 100 millones, y se aforaron a 1.0 ml. Las muestras se trataron con DTT en Trizma y SDS, y se sonicaron como se indica en Métodos para solubilizar las células y fluidificar la muestra. Respectivamente cada una se tomaron 0.4 ml, se diluyeron con 1.6 ml de PBS y se mezclaron antes de determinar su D.O. a 260 nm. El coeficiente de correlación lineal obtenido fue $r = 0.995$ y la pendiente, $m = 0.34$

RESULTADOS

Efecto del tipo y número de lavados sobre la concentración intraespermática de G6P

La concentración de G6P en los espermatozoides recién obtenidos de los conductos deferentes, y en los tratados según distintos esquemas de lavado fue determinada. Los resultados se muestran en la Tabla 1. Para realizar estos experimentos los gametos, provenientes de tres cuyos, por lo general 3, se mezclaron antes de ser lavados.

La cuantificación de la concentración de la G6P en los espermatozoides recién obtenidos mostró valores muy bajos del metabolito (rango 0.0 a 0.63 nmoles/ 10^8 espermatozoides); en 7 de las 11 determinaciones, la concentración fue menor a la sensibilidad del método.

Como puede observarse en la misma Tabla, en las 3 muestras que recibieron un sólo lavado, la concentración tendió a disminuir (rango 0.0 a 0.17 nmoles/ 10^8 espermatozoides) en relación a los valores de sus 3 correspondientes muestras no lavadas. Por otra parte, en los espermatozoides que se lavaron dos veces (este tratamiento será referido como normal) se observó un incremento en el contenido de la G6P. De las 11 muestras analizadas bajo estas condiciones, las once mostraron concentraciones medibles de la hexosa-fosfato. El rango observado fue de 0.24 a 2.24 nmoles/ 10^8 espermatozoides. La diferencia entre los promedios de las

TABLA 1. CONCENTRACION DE G6P EN ESPERMATOZOIDES RECIEN OBTENIDOS Y EN LOS SOMETIDOS A UNO Y DOS LAVADOS

Tratamiento	G6P (nmol/10 ⁸ sptz) ^a
Recién obtenidos ^b	0.22 ± 0.36 (11) ^d
	0.21 ± 0.36 (3) ^e
Lavados una vez ^c	0.06 ± 0.10 (3) ^e
Lavados dos veces	0.84 ± 0.66 (11) ^d
	0.39 ± 0.14 (3) ^e

^aLos valores representan $\bar{x} \pm$ d.e. (número de experimentos)

^bLos espermatozoides se extrajeron de cada conducto deferente con 2 ml de solución salina, y de inmediato se procesaron para la determinación de G6P como se describe en Métodos

^cLos espermatozoides obtenidos como en (b) se colectaron por centrifugación y se lavaron por resuspensión, una sola vez ó dos veces con 1.0 ml de solución salina por conducto

^dDe una misma suspensión de espermatozoides se obtuvieron muestras alícuotas para cuantificar la G6P en los espermatozoides recién obtenidos y en los lavados dos veces

^eDe la suspensión inicial de espermatozoides se tomaron muestras alícuotas para cuantificar la G6P en los recién obtenidos y en los lavados una y dos veces

concentraciones de la G6P en los espermatozoides lavados normalmente, contra sus correspondientes muestras de espermatozoides recién obtenidos, fue significativamente diferente ($p < 0,01$ de la prueba "t" de Student).

Para determinar si el aumento en la concentración de G6P intraespermática se debía al tratamiento de lavado de las células, se obtuvieron espermatozoides de los conductos deferentes de 3 cuyos por experimento, se mezclaron y dividieron en tres partes: una fue lavada dos veces con 1,0 ml de solución salina cada vez (L. normal); otra, dos veces con sólo 0,5 ml cada vez (L. medio); y la tercera no fue lavada, sino que se la mantuvo en la solución salina de extracción, y los cambios de temperatura durante los lavados de las muestras paralelas se compensaron en ella por su incubación a 37°C o su estancia a temperatura ambiente, según fuera lo apropiado. Los resultados se muestran en la Tabla 2. La concentración de G6P en las muestras no lavadas (incubadas) fue similar a la de las muestras lavadas bajo los dos tratamientos (L. normal y L. medio). Aunque, si bien es un poco mayor, no es estadísticamente diferente.

Glucosa libre en los espermatozoides de los conductos deferentes y en el plasma epididimal

Se mostró que los espermatozoides después de ser lavados (L. normal y L. medio), o incubados en la solución salina de extracción, presentaron una concentración de G6P superior a la observada en los gametos recién extraídos de los conductos

TABLA 2. EFECTO DEL TIPO DE LAVADO SOBRE LA CONCENTRACION DE G6P
INTRAESPERMATICA

Tipo de lavado ^a	G6P (nmol/10 ⁸ sptz) ^b
L. normal	0.44 ± 0.20
L. medio	0.42 ± 0.24
Incubados en salina	0.55 ± 0.27

^aLos espermatozoides se obtuvieron con 2 ml de solución salina, se mezclaron y dividieron en 3 partes para ser lavados. L. normal indica dos lavados con 1.0 ml de solución salina cada vez; L. medio, dos lavados con 0.5 ml; incubados en salina son los gametos que permanecieron en la solución salina en la cual se obtuvieron, y que se les compensaron los cambios de temperatura (ver texto)

^bLos valores son $\bar{X} \pm$ d.e. de 5 experimentos

deferentes. Con el fin de conocer si el incremento observado en la concentración de G6P intraespermático tenía su origen en glucosa libre, se valoró la concentración de la hexosa en los espermatozoides recién obtenidos, así como en el fluido que los baña, el plasma epididimal (véase Métodos).

En los espermatozoides recién obtenidos la glucosa libre no se encontró en cantidades detectables en tres experimentos; mientras que el plasma epididimal mostró una concentración promedio de glucosa de $2.5 \pm 1.42 \mu\text{M}$ (5 determinaciones).

Efecto de la extracción de los espermatozoides en un medio con glucosa sobre la RA

Con el fin de conocer si la presencia de glucosa en el medio de extracción permitía que la G6P se acumulara en el espermatozoide, y que, esta hexosa fosfato acumulada pudiera tener efecto sobre la velocidad de capacitación espermática, se realizaron los siguientes experimentos: los espermatozoides se obtuvieron de varios cuyos, generalmente 3, las muestras se mezclaron, y la suspensión celular se dividió en dos porciones, una de las cuales se diluyó con un volumen igual de solución salina, y la otra, con el mismo volumen de salina-glucosa (véanse Métodos). De inmediato los espermatozoides se lavaron dos veces siguiendo el esquema habitual (L. normal), y, ya lavados, se incubaron en MCM. La G6P se midió en las células lavadas y en las incubadas por 5 min en el MCM. El tiempo de aparición de la RA y su velocidad fueron

determinadas como se indica en Métodos.

La concentración de G6P en los gametos mostró ser mayor en las células que estuvieron en contacto con el azúcar (3.74 ± 1.22 nmoles/ 10^8 espermatozoides en 10 determinaciones de 4 experimentos) que en las que no lo estuvieron (1.05 ± 0.42 nmoles/ 10^8 espermatozoides en 8 determinaciones de 4 experimentos). Es decir, la hexosa fue captada y fosforilada, lo que causó que la concentración de G6P se elevara significativamente en relación a la mostrada por su control ($p < 0.025$). A los 3 minutos de la incubación en MCM, la concentración de la G6P en los espermatozoides disminuyó con respecto a la mostrada por las células lavadas, pero continuó siendo estadísticamente mayor ($p < 0.025$) en la muestra extraída con glucosa: 0.63 ± 0.35 nmoles/ 10^8 espermatozoides contra 0.35 ± 0.29 nmoles/ 10^8 espermatozoides lavados con salina (en 8 y 7 determinaciones, respectivamente, de 4 experimentos).

La valoración de la RA mostró que en dos muestras en las que la glucosa estuvo presente, el fenómeno se presentó más tardíamente, 4 y 25 min después que en sus controles, mientras que en los dos experimentos en los cuales se valoró la cinética de aparición de la RA, esta fue mayor en los espermatozoides que sólo se diluyeron con solución salina (9.9% y 13.0%) que en las que estuvieron expuestas a la glucosa (1.2% y 4.8%, respectivamente).

Efecto de la concentración de G6P intraespermática sobre la movilidad y la capacitación

El efecto de la concentración intraespermática de G6P sobre la duración de la movilidad se valoró durante la incubación de las células en solución salina, mientras que la capacitación, así como la velocidad de aparición de la RA en los espermatozoides se determinaron durante su incubación en el MCM. Para ésto, los espermatozoides se obtuvieron de un cuyo, se lavaron de acuerdo al esquema habitual (L. normal) y en una muestra alícuota se determinó la concentración de G6P. La suspensión restante de espermatozoides lavados se dividió en dos volúmenes iguales, y las células se resuspendieron e incubaron en los medios indicados, solución salina y MCM. La duración de la movilidad y el tiempo y velocidad de aparición de la RA se valoraron como se indica en Métodos.

Se encontró que la concentración de G6P en los espermatozoides lavados fue muy variable de muestra a muestra, y frecuentemente, no presentaron una concentración medible por el método (en 4 de las 9 muestras). Por otra parte, ni la duración de la movilidad, ni la aparición de la RA, y tampoco el porcentaje de células que expresaron la RA en el tiempo de valoración, guardaron relación lineal con la concentración de G6P de los espermatozoides lavados (véase la Tabla 3).

TABLA 3. CONCENTRACION DE G6P EN MUESTRAS AISLADAS Y SU RELACION CON LA MOVILIDAD Y LA CAPACITACION ESPERMATICA

G6P (nmol/10 ⁸ sptz ^a)	Movilidad (minutos) ^b	Reacción acrosomal ^c	
		Inicio (min)	Porcentaje
0.35 ± 0.42	21.2 ± 10.6	68.9 ± 29.9	18.2 ± 8.8
	r ^d = -0.221	-0.091	0.149

^aPara cada experimento, las muestras provienen de un cuyo. Los espermatozoides se lavaron según el esquema habitual (L. normal) para luego determinar la G6P. La concentración del metabolismo, y el tiempo se expresan como $\bar{X} \pm$ d.e. de los valores obtenidos de 9 experimentos. El porcentaje de RA se calculó de 7 experimentos.

^bLos espermatozoides lavados se incubaron a 37°C en solución salina, y la duración de su movilidad se determinó como se describe en Métodos.

^cLos espermatozoides lavados se incubaron a 37°C en MCM para determinar la RA como se indica en Métodos.

^dr es el valor del coeficiente de correlación evaluado entre el parámetro señalado y la concentración de la G6P.

Efecto de la incubación en MCM sobre la concentración de G6P y la capacitación espermiática

Como se indicó antes, el contenido de G6P en muestras espermiáticas individuales fue variable, y a menudo, no detectable. Para investigar más a fondo si un retardo en la presentación de la RA podría atribuirse a una mayor concentración de la hexosa fosfato intraespermiática, la valoración del metabolito se realizó en muestras obtenidas a los 5 min de iniciada su incubación en MCM, así como en los espermatozoides lavados.

En los 10 experimentos realizados, los espermatozoides lavados (L. normal) mostraron un contenido medible de G6P, corroborando lo obtenido antes. La concentración de G6P en los espermatozoides incubados 5 min en MCM varió aleatoriamente, con respecto a la observada en los espermatozoides lavados: en cinco de las diez determinaciones, la concentración mostró un leve aumento, en dos, se conservó y en los otros tres, tendió a disminuir.

La concentración de la G6P en los espermatozoides lavados o la presentada por los incubados 5 min en MCM se analizó con relación al tiempo en la cual las células mostraron la RA, así como con la velocidad con la cual ésta se presentó. No se encontró una relación lineal entre alguno de los parámetros indicados (Tabla 4).

TABLA 4. CONCENTRACION DE G6P EN LOS ESPERMATOZOIDES INCUBADOS EN MCM Y SU RELACION CON LA CAPACITACION

G6P (nmoles/10 ⁸ espermatozoides)		Reacción acrosomal ^c	
Lavados ^a	Incubados ^b	Inicio (min)	Porcentaje
0.92 ± 0.57 (8)	1.01 ± 0.47 (10)	65.7 ± 7.5 (6)	23.7 ± 11.5 (5)
	r_L^d	-0.203	0.066
	r_I	0.294	0.192

^aLos espermatozoides se lavaron por el esquema habitual (L. normal). Los valores en la Tabla son reportados como $\bar{x} \pm$ d.e. (número de experimentos).

^bLos espermatozoides lavados se incubaron a 37°C en MCM, y a los 5 min se extrajo una muestra alícuota para determinar la G6P.

^cLa RA se valoró en los gametos incubados en MCM como se describe en Métodos.

^dLos valores de inicio y porcentaje de la RA se correlacionaron contra la concentración de G6P en los espermatozoides lavados (r_L) o la de los lavados e incubados 5 min en MCM (r_I).

Efecto de los lavados en la concentración intraespermática del ATP

Debido a que la concentración de la G6P, una posible fuente energética de los espermatozoides, no mostró ninguna relación con el tiempo de su capacitación, ni con la velocidad de aparición de la RA, y a que el ATP es la principal molécula utilizada por las células para la obtención y almacén de energía, el nucleótido fue valorado para relacionar su concentración con los parámetros indicados.

Se obtuvieron espermatozoides, se mezclaron y lavaron una o dos veces por el método habitual (L. normal), y el ATP se valoró en la suspensión espermática recién obtenida y en los espermatozoides lavados una o dos veces.

La concentración de ATP mostrada por los gametos recién obtenidos fue muy variable de muestra a muestra. Se observó, además, que la concentración disminuyó desde 7.33 ± 3.33 nmol/ 10^8 espermatozoides luego de ser obtenidos (5 experimentos) a 4.9 ± 2.87 (3 experimentos) en los lavados una vez y 4.96 ± 2.43 (5 experimentos) en los lavados dos veces. La concentración del ATP en los espermatozoides lavados una sola vez no fue significativamente diferente de la de los espermatozoides recién obtenidos o lavados dos veces, pero la de espermatozoides recién obtenidos sí lo fue comparada con la mostrada por las células lavadas dos veces ($p < 0.01$).

Concentración de ATP intraespermático y su relación con el tiempo de capacitación de los espermatozoides

Los siguientes experimentos se realizaron para conocer si las células con mayor capacidad metabólico-energética (evaluada como concentración de ATP), presentaban más rápidamente la RA. En cada experimento, las muestras de los espermatozoides de cuyos se lavaron bajo los dos diferentes esquemas mencionados previamente, y otros se mantuvieron en la solución salina de extracción, como se indica en la Tabla 2. El ATP se valoró en los 3 tipos de muestras y en los espermatozoides que se transfirieron e incubaron 5 min en MCM.

La concentración espermática del ATP fue variable de experimento a experimento. En las células lavadas con 1.0 o 0.5 ml de solución salina, la concentración de ATP no fue significativamente diferente entre ambos tipos de muestras, pero la mostrada por las células lavadas con 0.5 ml sí lo fue con respecto a las incubadas en salina ($p < 0.02$; Tabla 5), que presentaron un mayor contenido de ATP. En los espermatozoides provenientes de la incubación en salina, y en seguida incubados 5 min en MCM, su concentración de ATP fue significativamente mayor ($p < 0.02$) que la presentada por las células lavadas con 0.5 ml, pero no lo fue con respecto a las lavadas con 1.0 ml, aunque la diferencia quedó en el límite de la significancia ($0.05 < p < 0.075$; Tabla 5).

TABLA 5. EFECTO DEL VOLUMEN DE LAVADO SOBRE LA CONCENTRACION DE ATP Y EN LA CAPACITACION DE LOS ESPERMATOZOIDES

Tipo de lavado ^a	ATP (nmoles/10 ⁸ spz)		Reacción acrosomal ^d	
	Lavados ^b	Incubados 5' en MCM ^c	Inicio (min)	Por ciento
L. normal	5.39 ± 4.82	4.93 ± 3.91	55.2 ± 11.3	11.2 ± 8.6
L. medio	4.46 ± 2.91	5.06 ± 4.62	55.2 ± 11.3	7.6 ± 5.1
Incubados en salina	6.10 ± 4.43	6.42 ± 5.44	79.6 ± 9.6	3.7 ± 1.7

^aLa suspensión de espermatozoides recién obtenidos fue dividida en tres partes, cada una de las cuales se trató como se indica en la Tabla 2 para su lavado. Los datos que se muestran son la $\bar{X} \pm$ d.e. de los valores obtenidos de 5 experimentos

^bDe las suspensiones de espermatozoides lavados o de los incubados en salina, se tomó una muestra alícuota para determinar el ATP

^cLos espermatozoides lavados o los incubados en salina se transfirieron a MCM a 37°C, y a los 5 min se extrajo una muestra alícuota para determinar el ATP

^dLa RA se determinó en los espermatozoides incubados en MCM como se indica en Métodos.

En 4 de los 5 experimentos realizados, la concentración del ATP en los espermatozoides incubados 5 min en MCM fue menor que la observada en sus correspondientes espermatozoides lavados, con 0.5 o 1.0 ml

Por otra parte, para una misma muestra, la aparición de la RA durante su incubación en MCM ocurrió en forma simultánea en los espermatozoides lavados con 1.0 o 0.5 ml, mientras que, invariablemente, la presentación de la RA fue posterior en los espermatozoides manejados en forma paralela, pero que no se lavaron. Además, consistentemente, el porcentaje de espermatozoides con RA siempre guardó el orden siguiente: lavados con 1.0 ml > lavados con 0.5 ml > incubados en la solución salina de extracción.

Cuando se correlacionó la concentración de ATP hallada en los espermatozoides lavados bajo cualquiera de los dos tratamientos, o la de los gametos no lavados, así como la concentración de ATP en las células incubadas en MCM 5 min, contra el tiempo y la velocidad de aparición de la RA, no se encontró relación lineal entre estos parámetros.

Efecto del bicarbonato sobre las concentraciones de G6P y ATP y sobre la movilidad y la capacitación espermáticas

a) Sobre las concentraciones de G6P y de ATP

Los gametos recién obtenidos se mezclaron y lavaron por el esquema habitual (L, normal). La suspensión celular se dividió en dos partes, una de las cuales se incubó en

solución salina como control, y la otra en esta solución suplementada con bicarbonato (véase Métodos). Las concentraciones de G6P y de ATP fueron determinadas en muestras alícuotas obtenidas a los 5 min de iniciada la incubación, así como en los espermatozoides lavados. Se encontró (Tabla 6) una concentración de G6P similar en los gametos incubados en solución salina y en los incubados en presencia del bicarbonato, así como con la presentada por los espermatozoides lavados. Por otra parte, la concentración del ATP de las células lavadas y de las incubadas en solución salina fue igual entre sí, mientras que la mostrada por los espermatozoides incubados en presencia del bicarbonato fue significativamente mayor a la de los espermatozoides lavados ($p < 0.01$), pero no a la de los incubados en salina. Se buscó una relación entre la concentración de ATP de las células lavadas con la de G6P de las mismas células. También se relacionaron ambos metabolitos en las células incubadas 5 min en salina y en salina-bicarbonato, y no se halló alguna correlación entre ambos parámetros. (Para realizar estas pruebas se consideraron los datos de las Tablas 6, 7 y 8).

TABLA 6. EFECTO DEL BICARBONATO SOBRE LA CONCENTRACION DE G6P Y DE ATP

Tratamiento	G6P (nmol/10 ⁸ sptz)	ATP (nmol/10 ⁸ sptz)	movilidad (min) ^c
Lavados ^a	1.03 ± 0.53	5.76 ± 1.76	-
Salina ^b	0.91 ± 0.41	6.10 ± 2.09	17.0 ± 4.9
Salina- bicarbonato	0.93 ± 0.52	7.19 ± 2.20	18.7 ± 2.9

^aDe la suspensión de espermatozoides lavados se tomó una muestra alícuota para determinar la G6P y el ATP. Los valores representan la $\bar{x} \pm$ d.e. de los datos de 4 experimentos.

^bLos gametos lavados se incubaron en solución salina o salina-bicarbonato, y a los 5 min se extrajo una muestra alícuota en la cual se determinaron la G6P y el ATP

^cLa movilidad se determinó como se indica en Métodos

b) Sobre la movilidad

La duración de la movilidad de los espermatozoides incubados en salina, en presencia o ausencia del bicarbonato, fue totalmente independiente tanto de la concentración de G6P como de la ATP presentada por las células lavadas, así como de la mostrada de ambos metabolitos por los espermatozoides a los 5 min de incubación en cualquiera de los dos medios (Tabla 6), aunque se observó que siempre el tipo de movilidad, evaluado subjetivamente, fue mejor en las células incubadas en salina-bicarbonato.

c) Sobre la capacitación

i) Durante una preincubación de 5 min

Los espermatozoides recién obtenidos se mezclaron y lavaron por el método habitual (L. normal). La incubación se inició por la adición de salina-bicarbonato. Durante esta incubación se obtuvieron pequeñas muestras cada 2 o 3 min, para registrar la permanencia de movilidad, y el proceso se continuaba hasta que los espermatozoides se observaron inmóviles. A los 5 min de iniciada la incubación en salina-bicarbonato, una muestra alícuota de espermatozoides se transfirió a MCM para determinar el tiempo de la aparición y la cinética de RA.

Cuando la concentración de G6P o de ATP mostrada por los gametos lavados fue alta, el porcentaje de RA de los espermatozoides incubados en MCM fue ligeramente mayor. Sin embargo, no se encontró una relación lineal entre estos parámetros. Por otro lado, el tiempo al que la RA se presentó en las muestras en MCM, fue independiente de las concentraciones de ambos metabolitos mostradas por los gametos lavados o por los medios incubados en el medio con bicarbonato (Tabla 7).

ii) Durante la preincubación por 35 min

Moreno (1985) comunicó que la preincubación de los espermatozoides durante 35 min en una solución salina suplementada con bicarbonato 25 mM permitía que los gametos expresaron la RA en los primeros 15 min luego de ser transferidos al MCM.

Los espermatozoides se obtuvieron y lavaron por el método habitual, se mezclaron y se preincubaron en salina-bicarbonato durante 35 min, al término de los cuales se transfirieron a MCM. El ATP y la G6P se determinaron en las células lavadas y en las preincubadas por 5, 15, 25 y 35 min en presencia del bicarbonato, así como en las transferidas a MCM e incubadas 5 min en este medio.

Las concentraciones de ambos metabolitos disminuyeron gradualmente a lo largo de la preincubación (Tabla 8).

TABLA 7. CONCENTRACION DE G6P Y DE ATP EN LOS ESPERMATOZOIDES LAVADOS Y EN LOS INCUBADOS EN SALINA-BICARBONATO. TABLA DE RELACIONES ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE METABOLITOS Y LA MOVILIDAD O REACCION ACROSOMAL.

Meta- bolito	Esperma- tozoides	Concentración (nmol/10 ⁸ sptz)	Movilidad (minutos) ^c	Reacción acrosomal ^d	
			16.5 ± 6.6	Inicio (min)	Por ciento
				75.4 ± 9.4	18.4 ± 5.6 (6)
G6P	Lavados ^a	0.72 ± 0.31	r = 0.788 ^e	r = 0.358	r = 0.746
	Incubados ^b	0.28 ± 0.19	r = 0.226	r = 0.824	r = 0.404
ATP	Lavados ^a	9.78 ± 3.96	r = 0.841	r = 0.518	r = 0.585
	Incubados ^b	6.29 ± 3.58	r = 0.808	r = 0.593	r = 0.266

^aDe los espermatozoides lavados en la forma habitual (L. normal) se extrajo una muestra alícuota para determinar la G6P y el ATP. Todos los valores son la $\bar{X} \pm$ d.e. de 8 experimentos, excepto de donde se indica.

^bLos espermatozoides lavados se incubaron a 37°C en salina-bicarbonato, y a los 5 min se extrajo una muestra alícuota para determinar los metabolitos.

^cEn los espermatozoides incubados en salina-bicarbonato, la movilidad se evaluó como se describe en Métodos.

^dDespués de 5 min en salina-bicarbonato a 37°C, los gametos se transfirieron a MCM para determinar la RA como se indica en Métodos.

^eLa movilidad, el inicio de la RA y su porcentaje se relacionaron contra la concentración de los metabolitos, y los valores correspondientes aparecen en la Tabla.

TABLA 8. EFECTO DE LA PREINCUBACION EN BICARBONATO SOBRE LAS
CONCENTRACIONES DE G6P Y DE ATP

Espermato- zoides	ATP (nmol/10 ⁸ sptz) ^a	G6P (nmol/10 ⁸ sptz) ^a
Lavados	8.88 ± 10.67	0.75 ± 0.31
Preincubados ^b	5 min	9.93 ± 13.24
	15 min	7.05 ± 7.46
	25 min	5.96 ± 6.04
	35 min	7.46 ± 9.73
Transferidos ^c	3.22 ± 5.50	0.24 ± 0.26

^a Los valores representan el $\bar{X} \pm$ d.e. de los datos de 5 experimentos

^b Los espermatozoides lavados se preincubaron hasta 35 min a 37°C en salina-bicarbonato, y a los tiempos indicados se extrajeron muestras alícuotas en las que se determinaron los metabolitos

^c Los espermatozoides preincubados 35 min en salina-bicarbonato se transfirieron a MCM a 37°C, y a los 5 min se tomó una muestra alícuota para determinar los metabolitos

En esta serie de experimentos se observó un coeficiente de correlación de 0.8 entre el porcentaje de espermatozoides con RA en los primeros quince minutos de la transferencia al MCM (14.2 ± 8.0) y la concentración del ATP intraespermático en los gametos lavados, mientras que el RA no mostró ninguna relación con la G6P mostrada por los mismos espermatozoides.

En dos ocasiones se tuvo, además, un control paralelo: espermatozoides de la misma suspensión lavada, y que fueron preincubados en solución salina simple, de forma simultánea a la incubada en salina con bicarbonato. Las concentraciones de los metabolitos de los espermatozoides descendieron de la manera señalada antes, cuando se preincubaron en salina-bicarbonato, y de forma más brusca en los espermatozoides preincubados en salina (Tabla 9). En esta solución las mayores caídas se observaron al inicio de las transferencias (de lavados a salina y de ésta a MCM).

Por otra parte, tanto la concentración del ATP, como la de G6P en los espermatozoides preincubados en salina con bicarbonato mostró valores más altos que las mostradas por los preincubados en salina al mismo tiempo.

TABLA 9. EFECTO DE LA PREINCUBACION DURANTE 35 MIN EN SALINA SIMPLE O SUPLEMENTADA CON BICARBONATO SOBRE LAS CONCENTRACIONES DE G6P Y DE ATP

Espermatozoides	ATP (nmol/10 ⁸ spz)		G6P (nmol/10 ⁸ spz)		
	Control	Experimental	Control	Experimental	
Lavados	4.20 ± 2.06 ^a		0.83 ± 0.25		
Preincubados ^b	5 min	2.30 ± 0.67	3.59 ± 1.16	0.30 ± 0.42	0.79 ± 0.26
	15 min	2.50	4.03	0.51	0.82
	25 min	2.12	3.05	0.47	0.72
	35 min	1.83 ± 0.28	2.56 ± 0.76	0.0	0.31 ± 0.43
Transferidos ^c	1.50 ± 0.33	2.37 ± 0.90	0.0	0.10 ± 0.14	

^a Los valores son la $\bar{X} \pm$ d.e. de 2 experimentos

^b Los espermatozoides lavados se preincubaron hasta 35 min a 37°C en salina (control) o salina-bicarbonato (experimental), y a los tiempos indicados se extrajeron alícuotas para determinar los metabolitos

^c A los 35 min de la preincubación, los espermatozoides se transfirieron a MCM, y a los 5 min se tomó una alícuota para determinar los metabolitos

En las muestras preincubadas en salina 35 min y transferidas al MCM, no se observó RA en los primeros 15 min de la transferencia, mientras que sí fue aparente en las preincubaciones en salina-bicarbonato y transferidas ($RA\% = 10.0 \pm 3.8$), lo que corrobora lo comunicado por Moreno (1985).

DISCUSION

Efecto de los lavados sobre el nivel de la G6P y la relación de la concentración con la capacitación y la expresión de la RA

Los espermatozoides después de dos lavados mostraron una concentración significativamente mayor ($p < 0.01$) de G6P que las células recién obtenidas de los conductos deferentes (Tabla 1). El precursor natural de la hexosa fosfato, la glucosa, se ha encontrado en el plasma epididimal de varias especies a concentraciones muy bajas o de "trazas" (Mann y Lutwak-Mann, 1981). En este trabajo, el sacárido libre en el plasma epididimal mostró una concentración de $2.5 \pm 1.42 \mu\text{M}$, mayor a lo reportado para otros animales (Mann y Lutwak-Mann, 1981). Esto no es sorprendente, ya que también se ha encontrado más glucosa en el plasma seminal del cuyo que en el de otras especies (Frenkel y col, 1975). Por otra parte, los espermatozoides de los conductos deferentes no mostraron una concentración detectable de glucosa libre. Es bien sabido que en otros tipos celulares el azúcar es captado e inmediatamente fosforilado, y en el espermatozoide parece ocurrir lo mismo.

Así, el incremento observado de G6P podría explicarse por glucosa epididimal pero no por glucosa espermática. Como otro precursor de la hexosa-fosfato, se podría considerar en primer término, a la fructosa-6-fosfato (F6P) espermática. La fructosa es cuantificable en el plasma epididimal de bovino: 7 mg/100 ml (Mann, 1975); y existen todas las enzimas de la vía glucolítica en

el espermatozoide, de forma que la F6P podría ser convertida a G6P por la isomerasa específica, quizá como resultado de una disminución en el metabolismo glucolítico/fructolítico (Hoskins, 1973), a consecuencia de los lavados, tal vez debido al pH ácido (5.5) de la solución salina (Rose y Rose, 1969). Otro posible precursor causante del incremento en la concentración de la G6P podría ser el sorbitol, un azúcar-alcohol cíclico, componente normal del plasma epididimal (< 1 a 306 mg/100 ml; Mann, 1975; Mann y Lutwak-Mann, 1981). Este metabolismo puede ser convertido a glucosa o a fructosa por reductasas estereoespecíficas, una de las cuales, la sorbitol-deshidrogenasa (cetosa-reductasa), que produce fructosa, se ha reportado en el espermatozoide de carnero (Mann y Lutwak-Mann, 1981). El sorbitol, aunque es metabolizado, no puede soportar una alta movilidad ni una síntesis elevada de ATP en el espermatozoide (Hoskins, 1973). Una tercera posibilidad para explicar el incremento en la concentración de G6P podría ser, que ésta provenga del mio-inositol, otro azúcar-alcohol cíclico, presente en el plasma epididimal de varias especies (de 10 a 45 mg/100 ml; Mann y Lutwak-Mann, 1981), y del que existen evidencias que es secretado por el propio epidídimo (Cooper y col, 1985). La formación del mio-inositol en el espermatozoide se ha descrito que ocurre a partir de la glucosa, con la G6P como intermediario (Mann y Lutwak-Mann, 1981; Rancour y Welles, 1982). Sin embargo, la vía inversa, de formación de glucosa a partir del mio-inositol no se

ha descrito en el espermatozoide, pero si se ha postulado que ocurre en el riñón (Charalampous y Lyras, 1957).

Por otra lado, cuando la glucosa fue adicionada al medio de la obtención de las células se observó una acumulación intracelular de la hexosa fosfato, y el tiempo de expresión de la RA y su cinética se vieron afectados. Además, los gametos que se mantuvieron en presencia del fluido epididimal y diluidos en salina, mostraron también una alta concentración de G6P al término de la preincubación; y al ser transferidos al MCM, presentaron, al igual que los espermatozoides obtenidos en presencia de glucosa y lavados, un retardo en la expresión de la RA, y esta reacción se presentó en un porcentaje menor de espermatozoides.

Rogers y Yanagimachi (1975b) encontraron que en presencia de glucosa, la aparición de la RA era más tardía, y propusieron que se debía a un retardo en la capacitación, pero Mújica y Valdés-Ruiz sugirieron que la glucosa no retardaba la capacitación, aún más, era capaz de llevarla a cabo, en poco tiempo, pero que impedía la RA. Estos últimos autores propusieron que el éster fosfórico del azúcar, la G6P, fuera el que inhibiera a la RA, la cual se presentaría al bajar el metabolito a niveles permisivos. Nuestros resultados son más acordes a lo reportado por Mújica y Valdés-Ruiz (1983), ya que tanto en las células no lavadas, como en las cargadas con glucosa, donde la concentración de la G6P fue más alta que la de las lavadas normalmente, la RA apareció más tardíamente y el porcentaje de RA fue menor.

Sin embargo, cuando los espermatozoides lavados normalmente se incubaron en MCM con el fin de evaluar la aparición y la cinética de la RA, ambos parámetros fueron independientes de la concentración observada de G6P en los gametos lavados y de la que mostraron a los 5 min de su incubación en MCM (Tablas 3 y 4), más bien parecerían relacionadas con las características propias de las muestras. Debe tenerse en cuenta que durante su capacitación en MCM, los gametos se vieron expuestos a sustratos exógenos, lactato y piruvato, y que éstos pueden influir en la capacitación (Rogers y Yanagimachi, 1975).

Por otra parte, de los resultados fue aparente que el lavado de las células disminuyó el tiempo requerido para la capacitación, quizá por una remoción más rápida de componentes glicoprotéicos del plasma epididimal, algunos de los cuales se han descrito como retardadores o inhibidores de la capacitación, y se les ha designado como Factor(es) descapacitante(s) (Aonuma y col, 1982; Davis y Davis, 1983; Reddy y col, 1979; Van der Ven y col, 1982).

Efecto de los niveles intraespermáticos de ATP sobre la capacitación y la RA

Cuando el ATP se valoró en los espermatozoides durante el proceso de lavado, se observó que la concentración del nucleótido descendió gradualmente, paralelo al incremento en la concentración de la G6P intracelular. Lo anterior podría ser explicado por una captación y fosforilación de la glucosa o de otros precursores de la G6P, con utilización de ATP.

Igualmente, el decremento de la concentración celular de ATP durante el lavado puede atribuirse a su utilización para la movilidad; ya que las células al ser diluidas durante su extracción inician el movimiento y lo mantienen a lo largo de su lavado.

Cuando se relacionó la concentración de ATP observado en las células lavadas contra el inicio de la RA y su cinética, no se observó una correlación lineal. Por otra parte, el ATP de las células no lavadas, preincubadas en salina, fue más alto (el valor); sin embargo, la RA se presentó en estas células más tardíamente, y su cinética fue menor que la mostrada por los gametos no lavados. Esto podría ser atribuido, como ya se mencionó, a la permanencia de factores discapacitantes provenientes del fluido epididimal.

Efecto del bicarbonato sobre la movilidad, el metabolismo y la capacitación espermáticas

Los espermatozoides lavados, incubados en salina simple o salina-bicarbonato, permanecieron móviles durante un tiempo similar, y la duración fue independiente de la concentración de ATP o G6P, así como de la mostrada por las células a los 5 min de incubación en cualquiera de los dos medios (Tabla 6), aunque siempre el tipo de movilidad subjetiva de los espermatozoides en salina-bicarbonato fue aparentemente mejor.

Los niveles de G6P y de ATP disminuyeron tanto en los espermatozoides incubados en salina simple como en salina-bicarbonato. Sin embargo, en los incubados durante 5 min en

presencia del bicarbonato la concentración de ambos metabolitos fue mayor, que la observada en los espermatozoides incubados en salina (Tabla 6) esto se repitió cuando la incubación se realizó hasta por 35 min (Tabla 9). Por la presencia de bicarbonato, se esperaba una concentración de ATP mayor, ya que es sabido que la glucólisis se acelera a pH elevado, sin embargo, no se esperaba que la G6P también se mantuviera más alta en los espermatozoides incubados en el medio con bicarbonato. La mayor concentración de ATP en presencia del bicarbonato podría explicarse por un mayor metabolismo diferente al glicolítico, ya que el gasto energético por movilidad sería aparentemente igual (por la duración), o ligeramente mayor en presencia del bicarbonato, donde las células presentaron un movimiento un poco más activo.

Otra explicación sería que el precursor (sugerido previamente) de la G6P aún se encontrara dentro de la célula en cantidad suficiente para ser convertido a la hexosa fosfato a mayor velocidad, y esto, a su vez, redundara en una glicólisis acelerada, que concordaría con el incremento observado de ambos metabolitos.

Los espermatozoides preincubados en salina o salina-bicarbonato dejan de moverse pronto, pero se mantienen viables, ya que, al ser transferidos a MCM, pueden recuperar su movilidad y expresar la RA dentro de los primeros 15 min de su transferencia cuando la preincubación se realizó en el medio con bicarbonato (Tablas 8 y 9) o a tiempos más largos en los gametos preincubados en salina, lo que concuerda con lo observado por Moreno (1985).

La movilidad de los espermatozoides preincubados en salina simple o salina-bicarbonato cesó cuando las células aún contenían niveles altos de ATP. Esto fue observado también en los gametos del bovino por Hoskins (1973). El Ca^{2+} se ha sugerido que participa en la movilidad (Tash y Means, 1983), y al Mg^{2+} se le reporta como necesario para la movilidad en ausencia de Ca^{2+} (Hyne y cols, 1984). Se podría considerar que un equilibrio entre ambas iones celulares con el medio de incubación causara una disminución de la concentración intracelular de los mismos, a niveles no permisivos para la movilidad espermática.

El efecto de la preincubación en presencia de bicarbonato sobre la capacitación espermática comunicado por Moreno (1985) fue corroborado con los resultados de este trabajo. Treinta y cinco minutos de preincubación permitieron que los espermatozoides transferidos al MCM mostraran la RA dentro de los primeros quince minutos de su transferencia, no así los controles preincubados en salina simple. Se indicó arriba que la concentración intraespermática del ATP cuando el medio de incubación contenía bicarbonato fue más elevada, que en su ausencia por lo cual podría sugerirse que este mayor estado energético sostenido por las células, las ayude a capacitarse. El efecto del bicarbonato sobre el metabolismo y la capacitación del espermatozoide había sido sugerido (Chang, 1957; Foley y Williams, 1967; Murdoch y White, 1968a, b). Así mismo, Hyne y Edwards (1985) comunicaron que una alta concentración espermática de ATP acorta el período de

capacitación. Contrario a ésto, Rogers y Morton (1973) mostraron que en el espermatozoide del hámster, el nivel total de ATP desciende de 3 a 5 veces durante una incubación capacitante. Por otra parte, se ha descrito que la síntesis de ATP por sustratos endógenos es constante, y que en la producción total de ATP participan además los sustratos exógenos (Inskeep y Hammerstedt, 1985). En este trabajo, se encontró que la concentración de ATP, durante la incubación capacitante en salina-bicarbonato, disminuyó gradualmente aunque se mantuvo más elevada que la presentada por los espermatozoides en una incubación no capacitante, en salina simple. Por otra parte, la RA bajo las condiciones experimentales de este trabajo, no pareció ser soportada por los sustratos endógenos, sino requerir de la presencia de los sustratos exógenos lactado y piruvato, ya que se presentó dentro de los primeros 15 min después de la transferencia al MCM.

Se ha hecho mucha referencia, a que la movilidad no se mantuvo por tiempo prolongado (no mayor a los 30 min) en los espermatozoides preincubados en salina o en salina-bicarbonato. Esto está de acuerdo a lo comunicado por Hyne (1984), quien observó que el bicarbonato y el calcio son indispensables para mantener la movilidad espermática en ausencia de sustratos exógenos. La presencia de ambos iones en el medio causa una elevación del AMP_c espermático (Hyne, 1984; Garbers y cols, 1982; Okamura y cols, 1985). También se ha propuesto que el efecto sobre la elevación del AMP_c por el bicarbonato se deba a una alcalinización del

citosol espermático (Vijayaraghavan y cols, 1983), además, el AMP_c se ha involucrado como un componente de la capacitación (Garbers y Kopf, 1980). La ausencia de Ca²⁺ durante la preincubación en salina o salina-bicarbonato podría ser el factor limitante de la movilidad espermática.

En este trabajo se ha mostrado que el ion bicarbonato tiene un efecto sobre el ATP, la G6P y la capacitación espermática. Sin embargo, de los resultados mostrados, no se puede afirmar que el efecto del bicarbonato sobre los metabolitos sea lo que permite la capacitación de los espermatozoides.

CONCLUSIONES

1. En los espermatozoides recién obtenidos de los conductos deferentes del cuyo la concentración de G6P es limitada, y frecuentemente no detectable. En los espermatozoides lavados, la concentración de G6P fue siempre medible, aunque variable de muestra a muestra.
2. Se sugiere la existencia, en el espermatozoide y/o en el líquido epididimal, de un precursor o precursores de la G6P, los cuales causan en el espermatozoide un incremento en la concentración de la hexosa fosfato, como resultado de los lavados celulares. Como precursor se descarta a la glucosa libre intraespermática, y se consideran poco factibles a la del plasma epididimal y a la F6P espermáticas. Por otra parte, al sorbitol o al mio-inositol espermáticos, o constituyentes del plasma epididimal, se les podría también atribuir la función precursora.
3. En los gametos no lavados, preincubados en salina, y en los obtenidos con glucosa y lavados, se observó una concentración más elevada de G6P que en los lavados normalmente; así como un retardo e inhibición parcial de la RA, aunque no hay evidencia directa de que el nivel de la G6P sea el causante, es importante señalar la coincidencia.
4. La concentración del ATP disminuyó con el número de los lavados; tal vez debido a su utilización para la movilidad y/o la fosforilación del precursor de la G6P, la que se incrementa

con los lavados.

5. La movilidad, así como el tiempo de aparición y la cinética de la RA parecen ser independientes de la concentración celular de G6P o de ATP que presentan los espermatozoides lavados, e igualmente de lo que muestran a los 5 min de su incubación en MCM.
6. Parece ser insuficiente el metabolismo de los sustratos endógenos para la expresión de la RA, ya que esta sólo se presenta en el MCM, que tiene lactato y piruvato.
7. Para la conservación de la movilidad espermática, parece ser insuficiente la presencia de los iones sodio y bicarbonato en la preincubación de los espermatozoides.
8. El ión bicarbonato parece mejorar el tipo, aunque no la duración de la movilidad espermática. Además, mantiene elevados los niveles de ATP y la G6P en una preincubación capacitante. Sin embargo, no puede aseverarse que los efectos causados por el bicarbonato sobre el metabolismo, sean, a su vez, causantes de la capacitación.

REFERENCIAS

- Aonuma, S., Okabe, M., Kishi, Y., Kawaguchi, M. and Yamada, H.
1982. Capacitation inducing activity of serum albumin in
fertilization of mouse ova *in vitro*. J. Pharm. Dyn. 5: 980-
987
- Austin, C.R. 1951. Observations on the penetration of sperm into
the mammalian egg. Aust. J. Sci. Res. B. 4: 581-589
- Austin, C.R. and Bishop, M.W.H. 1958. Role of rodent acrosome and
performation in fertilization. Proc. R. Soc. Lond. B. Biol.
Sci. 149: 241-248
- Barros, C., Berríos, M. and Herrera E. 1973. Capacitation *in*
vitro of guinea-pig spermatozoa in a saline solution. J.
Reprod. Fert. 34: 547-549
- Bedford, J.M. 1970. Sperm capacitation and fertilization in
mammalians. Biol. Reprod. (Suppl.) 2: 128-158
- Casillas, E.R. 1972. The distribution of carnitine in male
reproductive tissues and its effects on palmitate oxidation
by spermatozoal particles. Biochim. Biophys. Acta. 280: 545-
551
- Chang, M.C. 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited
into the fallopian tubes. Nature 168: 697-698
- Chang, M.C. 1957. A detrimental effect of seminal plasma on the
fertilizing capacity of sperm. Nature 179: 258-259

- Charalampous, F.C. and Lyras, C. 1957. Biochemical studies on inositol. IV. Conversion of inositol to glucuronic acid by rat kidney extracts. *J. Biol. Chem.* 228: 1-13
- Cleland, W.W. 1964. Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups. *Biochem.* 3: 480-482
- Cooper, T.G., Yeung, C.H., Lui, W. and Yang, C.Z. 1985. Luminal secretion of myo-inositol by the rat epididymis perfused *in vitro*. *J. Reprod. Fert.* 74: 135-144
- Daniel, W.W. 1977. Bioestadística. Limusa. México, D.F. pp. 132-140; 243-290
- Davis, B.K. 1984. Timing of fertilization in mammals: sperm cholesterol/phospholipid ratio as a determinant of the capacitation. *Proc. Nat. Acad. Sci. US* 78: 7560-7564
- Davis, B.K., Brine, R. and Hungund, B. 1979. Studies on the mechanism of capacitation. II. Evidence for lipid transfer between plasma membrane of rat sperm and serum albumin during capacitation *in vitro*. *Biochim. Biophys. Acta.* 558: 275-266
- Davis, B.K. and Davis, N.V. 1983. Binding by glycoproteins of seminal plasma membrane vesicles accelerates decapacitation in rabbit spermatozoa. *Biochim. Biophys. Acta.* 77: 70-76
- 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

- Frenkel, G., Peterson, R.N. and Freund, M. 1975. Oxidative and glycolytic metabolism of semen components by washed guinea pig spermatozoa. *Fertil. Steril.* 26: 144-147
- Friend, D.S., Orci, L., Perrelet, A. and Yanagimachi, R. 1977. Membrane particle changes attending the acrosome reaction in guinea pig spermatozoa. *J. Cell Biol.* 74: 561-577
- Garbers, D.L. and Kopf, G.S. 1980. The regulation of spermatozoa by calcium and cyclic nucleotides. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 13: 251-387
- Garbers, D.L., Tubb, D.J. and Hyne, R.V. 1982. A requirement of bicarbonate for Ca^{2+} -induced elevations of cyclic AMP in guinea pig spermatozoa. *J. Biol. Chem.* 257: 8980-8984
- Green, D.P.L. 1982. The course of the acrosome reaction in guinea pig sperm. *J. Cell Sci.* 54: 161-171
- Hammerstedt, R.H. and Lardy, H.A. 1983. The effect of substrate cyclic on the ATP yield of sperm glycolysis. *J. Biol. Chem.* 258: 8759-8768
- Hartree, E.F. and Mann, T. 1959. Plasmalogen in ram semen, and its role in sperm metabolism, *Biochem. J.* 71: 423-434
- Hartree, E.F. and Mann, T. 1960. Phospholipids in ram semen; metabolism of plasmalogen and fatty acids. *Biochem. J.* 80: 464-476
- Hernández-Montes, H., Iglesias, G. and Mújica, A. 1973. Selective solubilization of mammalian spermatozoa structures. *Exptl. Cell Res.* 76: 437-440

- Hoskins, D.D. 1973. Adenine nucleotide mediation of fructolysis and motility in bovine epididymal spermatozoa. *J. Biol. Chem.* 248: 1135-1140
- Hyne, R.V. 1984. Bicarbonate and calcium-dependent induction of rapid guinea pig sperm acrosome reactions by monovalent ionophores. *Biol. Reprod.* 31: 312-323
- Hyne, R.V. and Edwards, K.P. 1985. Influence of 2-deoxy-D-glucose and energy substrates on guinea pig capacitation and the acrosome reaction. *J. Reprod. Fert.* 73: 59-69
- Hyne, R.V. and Garbers, D.I. 1981. Requirement of serum factors for capacitation and the acrosome reaction of guinea pig spermatozoa in buffered medium below pH 7.8. *Biol. Reprod.* 24: 257-266
- Hyne, R.V., Higginson, R.E., Kohlman, D. and Lopata, A. 1984. Sodium requirement for capacitation and membrane fusion during the guinea-pig sperm acrosome reaction. *J. Reprod. Fert.* 70: 83-94
- Inskeep, P.B. and Hammerstedt, R.H. 1982. Changes in metabolism of ram sperm associated with epididimal transit or induced by exogenous carnitine. *Biol. Reprod.* 27: 735-743
- Inskeep, P.B. and Hammerstedt, R.H. 1985. Endogenous metabolism by sperm in responses to altered cellular ATP requirements. *J. Cell Physiol.* 123: 180-190

- Kinsley, W.H. and Koehler, J.K. 1978. Cell surface changes associated with *in vitro* capacitation of hamster sperm. J. Ultraestr. Res. 64: 1-13
- Koobs, D.H. 1972. Phosphate mediation of the Crabtree and Pasteur effects: Does a change in energy metabolism enhance the potential for malignancy? Science 178: 127-133
- Lambert, H., Overstreet, J.W., Morales, P., Hanson, F.W. and Yanagimachi, R. 1985. Sperm capacitation in the human female reproductive tract. Fertil. Steril. 43: 325-327
- Lardy, H.A. and Phillips, P.H. 1941. The interrelation of oxidative and glycolytic process as sources of energy for bull spermatozoa. Am. J. Physiol. 133: 602-609
- Llanos, M.N. and Meizel, S. 1983. Phospholipid methylation increases during capacitation of hamster sperm *in vitro*. Biol. Reprod. 28: 1043-1051
- Mack, S., Battacharyya, A.K., Joyce, C., Van der Ven, H. and Zaneveld, L.J.D. 1983. Acrosomal enzymes of human spermatozoa before and after *in vitro* capacitation. Biol. Reprod. 28: 1032-1042
- Maitra, P.K. and Estabrook, R.W. 1984. A fluorometric method for the enzymic determination of glycolytic intermediates. Anal. Biochem. 7: 472-484
- Mann, T. 1945. Studies on the metabolism of semen. 2. Glycolysis in spermatozoa. Biochem. J. 39: 458-465

- Mann, T. 1946. Studies on the metabolism of semen. 3. Fructose as a normal constituent of seminal plasma. Site of formation and function of fructose in semen. *Biochem. J.* 40: 481-491
- Mann, T. 1949. Metabolism of semen. *Adv. Enzymol.* 9: 329-390
- Mann, T. 1975. Biochemistry of semen. *Handbook of Physiology-endocrinology* 5: 461-472
- Mann, T. and Lutwak-Mann, C. 1981. Male reproductive function and semen. Springer-Verlag. New York. pp. 495
- McRorie, R.A. and Williams, W.L. 1974. Biochemistry of mammalian fertilization. *Ann. Rev. Biochem.* 43: 777-803
- Moreno, R.R. 1985. Estudio del proceso de capacitación y de la reacción acrosomal en espermatozoides de cuyo en un sistema *in vitro*. Tesis profesional. ENEP-Iztacala UNAM.
- Morton, B., Rogers, B.J. and Chang, T.S.K. 1973. Capacitation of large numbers of hamster sperm *in vitro*. *Biol. Reprod.* 9: 356-360
- Mújica, A. and Valdés-Ruiz. 1983. On the role of glucose in capacitation and acrosome reaction of guinea pig sperm. *Gamete Res.* 8: 335-344
- 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. *Am. J. Biol. Sci.* 21: 973-980
- Okamura, N., Tajima, Y., Soejima, A., Masuda, H. and Sugita, Y. 1985. Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 260: 9699-9705
- Oliphant, G. and Brackett, B.G. 1973. Immunological assesment of surface changes on rabbit sperm undergoing capacitation. *Biol. Reprod.* 9: 404-414
- O'Rand, M.G. 1977. Restriction of a sperm surface antigen's motility during capacitation. *Develop. Biol.* 55: 260-270
- Peterson, R.N. and Freund, M. 1969. Glycolysis of washed suspension of human spermatozoa. Effect of substrate, substrate concentration and changes in medium composition on the rate of glycolysis. *Biol. Reprod.* 1: 238-246
- Primakoff, P., Myles, D.G. and Bellu , A.R. 1980. Biochemical analysis of the released products of the mammalian acrosome reaction. *Develop. Biol.* 80: 324-331
- Rancour, T.P. and Welles, W.W. 1980. Myo-inositol metabolism in rat testis in response to streptozotocin-induced diabetes. *Arch. Biochem. Biophys.* 202: 150-159

- Reddy, J.M., Stark, R.A. and Zaneveld, J.D. 1979. A high molecular weight antifertility factor from human seminal plasma. *J. Reprod. Fert.* 57: 437-466
- Rogers, B.J., Chang, L. and Yanagimachi, R. 1979. Glucose effect on respiration: possible mechanism 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. and Yanagimachi, R. 1975a. Release of hyaluronidase from guinea-pig spermatozoa through an acrosome reaction initiated by calcium. *J. Reprod. 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. Reprod.* 13: 568-575
- Rose, I.A. and Rose, Z.B. 1969. Glycolysis: regulation and mechanism of the enzymes. In Florin, M. and Stotz, E.H. (editors). *Comprehensive Biochemistry*. Elsevier Publishing Co. 17: 43-161
- Santos-Sacchi, J. and Gordon, M. 1982. The effect of ATP depletion upon the acrosome reaction in guinea pig sperm. *J. Androl.* 3: 108-112

- Singh, J.P., Babcock, D.F. and Lardy, H.A. 1978. Increased calcium-ion influx is a component of capacitation of spermatozoa. *Biochem. J.* 172: 549-556
- Talbot, P., Summers, R.G., Hylander, B.L. Keough, E.M. and Franklin, L.E. 1979. The role of calcium in the acrosome reaction: an analysis using ionophore A28137. *J. Exp. Zool.* 198: 383-392
- Tash, J.S. and Means, A.R. 1983. Cyclic adenosine 3'5'-monophosphate, calcium, and protein phosphorilation in flagellar motility. *Biol. Reprod.* 28: 75-104
- Vijayaraghavan, S., Critchlow, L.M. and Hoskins, D.D. 1985. Evidence for a role for cellular alkalinization in the cyclic adenosine 3'5'-monophosphate mediated initiation of motility in bovine caput spermatozoa. *Biol. Reprod.* 32: 489-500
- Van der Ven, H., Battacharyya, A.K., Binor, Z., Leto, S., Zaneveld, L.J.D. 1982. Inhibition of human sperm capacitation by a high-molecular-weight factor from human seminal plasma. *Fertil. Steril.* 38: 753-755
- Williamson, J.R. and Corkey, B.E. 1969. Assays of intermediates on the citric acid cycle and related compounds by fluorometric enzyme methods. In Lowenstein, R. (editor), *Methods. Enzymol.* 13: 488-491
- Yanagimachi, R. 1969. *In vitro* capacitation of hamster spermatozoa by follicular fluid. *J. Reprod. Fert.* 18: 275-286

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