



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
"IZTACALA"

“Efecto de la glucosa sobre el AMPc, el metabolismo energético y la movilidad del espermatozoide de la rata al inicio de la capacitación”.

T E S I S

Que para obtener el Título de:

B I O L O G O

P r e s e n t a :

MARIA DEL ROCIO VARGAS MARTINEZ



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.

DEDICATORIA

A mis padres

A Roberto

AGRADECIMIENTOS

A la Doctora Mújica, por su asesoría y sobre todo por su enorme paciencia.

A Begoña y a Lety, por toda su ayuda y por brindarme su amistad.

A Don José (q.e.p.d.), por su ayuda y por haberme librado en ocasiones de la tarea más penosa de este trabajo.

Al azar, que me permitió conocer a la Biología a través del Plan Modular.

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Biología Celular del CINVESTAV, en el laboratorio y bajo la dirección de la Doctora Adela Mújica de Hernández.

Este proyecto fue apoyado con los siguientes donativos:

COSNET 769.87 y

CONACyT PCSABNA-022048

Además se recibió apoyo económico de la DGAPA por un año y de COSSIES por seis meses.

INDICE

| | página |
|---|--------|
| INTRODUCCION | 1 |
| La reproducción sexual | 1 |
| Fertilización interna | 2 |
| La reproducción en los mamíferos | 2 |
| Espermatogénesis | 3 |
| Estructura del espermatozoide | 7 |
| Metabolismo espermático | 13 |
| Movilidad espermática | 20 |
| Papel del AMPc | 22 |
| ANTECEDENTES | 26 |
| OBJETIVOS | 29 |
| METODOLOGIA | 31 |
| Obtención de los espermatozoides | 31 |
| Evaluación del número de espermatozoides | 32 |
| Determinación del tipo de movilidad espermática | 34 |
| Tiempo de iniciación de la movilidad | 36 |
| Niveles intraespermáticos de AMPc | 36 |
| Purificación parcial de la proteína cinasa dependiente de AMPc | 40 |
| Niveles intraespermáticos de ATP | 45 |
| Medición del consumo de oxígeno espermático | 46 |
| Análisis estadístico | 48 |

| | |
|--|---------|
| RESULTADOS | 49 |
| Movilidad espermática | 49 |
| Niveles de AMPc intraespermático | 53 |
| Niveles intraespermáticos de ATP | 58 |
| Consumo de oxígeno | 61 |
| DISCUSION | 64 |
| Movilidad | 65 |
| Niveles de ATP | 69 |
| Consumo de oxígeno | 70 |
| Niveles de AMPc | 72 |
| CONCLUSIONES | 75 |
| BIBLIOGRAFIA | 77 |
| APENDICE | 84 y 85 |

Yo no haré más que cantar, no haré más que preguntar:
Soy acaso como flor?
La sembraré una vez más?
Soy cual mata de maíz?
Habré de ser otra vez sembrado?
Mi padre, mi madre acaso, me habrán de engendrar
de nuevo? ...

Cant. Mex. f.13 v., lin 19 ss. Poema recogido en
Huexotzinco (fragmento).

EFEECTO DE LA GLUCOSA SOBRE EL AMPc, EL METABOLISMO
ENERGETICO Y LA MOVILIDAD DEL ESPERMATOZOIDE
DE LA RATA AL INICIO DE LA CAPACITACION.

INTRODUCCION

LA REPRODUCCION SEXUAL.

La aparición de la reproducción sexual en los organismos dio un nuevo sentido a la vida, al proporcionarle una de sus estrategias adaptativas más importantes: la manera de incorporar cambios genéticos para producir variabilidad (Margulis, 1986). Al introducirse la reproducción sexual, la recombinación genética se convirtió en la nueva manera de incrementar la variabilidad de los individuos, de tal forma que cada miembro de la nueva progenie se constituyó como una creación única, por contener el genoma de sus ancestros mezclado en una forma irrepetible. El proceso biológico que hizo posible el enriquecimiento genético descrito es la meiosis, cuyo producto son las células sexuales o gametos, que al unirse originan un nuevo individuo cuyo principal papel biológico será la perpetuación de la especie (Ohno, 1980).

FERTILIZACION INTERNA

Antes de que los animales con reproducción sexual invadieran el ámbito terrestre, la fertilización tenía lugar en el medio acuoso, en donde los gametos eran liberados para su posterior encuentro. Una manera más eficaz de asegurar la reproducción fue por medio de la fecundación interna, en la cual el macho depositaba los espermatozoides en el interior del tracto reproductor de la hembra, coordinando este evento con la liberación interna de los óvulos. La fertilización interna se optimizó en el transcurso evolutivo, y su eficacia se debe al surgimiento de estructuras especializadas (órganos copuladores y tractos reproductores) que facilitaron el encuentro óvulo-espermatozoide al reducir las distancias que debía atravesar el gameto masculino y proporcionar un medio fisiológico apropiado. Las consecuencias evolutivas son evidentes: sólo aquellos animales que adquirieron la fecundación interna fueron capaces de lograr una completa emancipación del medio acuoso, lo que les permitió conquistar el ambiente terrestre.

LA REPRODUCCION EN LOS MAMIFEROS

En la Clase *Mammalia*, la reproducción involucra una serie de procesos sumamente complejos, que comprenden desde la formación de gametos (ovogénesis y espermatogénesis), hasta el nacimiento del

nuevo individuo.

Los gametos son formados en las gónadas, órganos especializados para la producción de células sexuales y con funciones de glándulas endócrinas. Los óvulos son formados en los ovarios, donde se lleva a cabo la meiosis, la cual se inicia durante la vida embrionaria de la hembra; mientras que los espermatozoides son producidos en los testículos por el mismo proceso una vez que el macho ha llegado a la madurez sexual (Byskov, 1982), (Fig. 1).

ESPERMATOGENESIS

Desde que las gónadas comienzan a diferenciarse morfológicamente en ovario o testículo, las células germinales son llamadas oogonias y espermatogonias respectivamente. Antes de iniciar la reducción cromosómica por meiosis, las células se dividen mitóticamente, después de iniciada la meiosis, serán incapaces de volver a multiplicarse. En el macho, la proliferación de las células se inicia una vez llegando a la pubertad y se mantendrá con carácter de indefinida, a diferencia de la hembra, en la que la mitosis se presenta sólo durante la vida embrionaria.

Los espermatogonios son clasificados en tres tipos: A, intermedios y B, de acuerdo con su cercanía a la división meiótica. Después de la última división mitótica de los espermatogonios B, la célula (ahora espermatocono primario) duplica su DNA como si

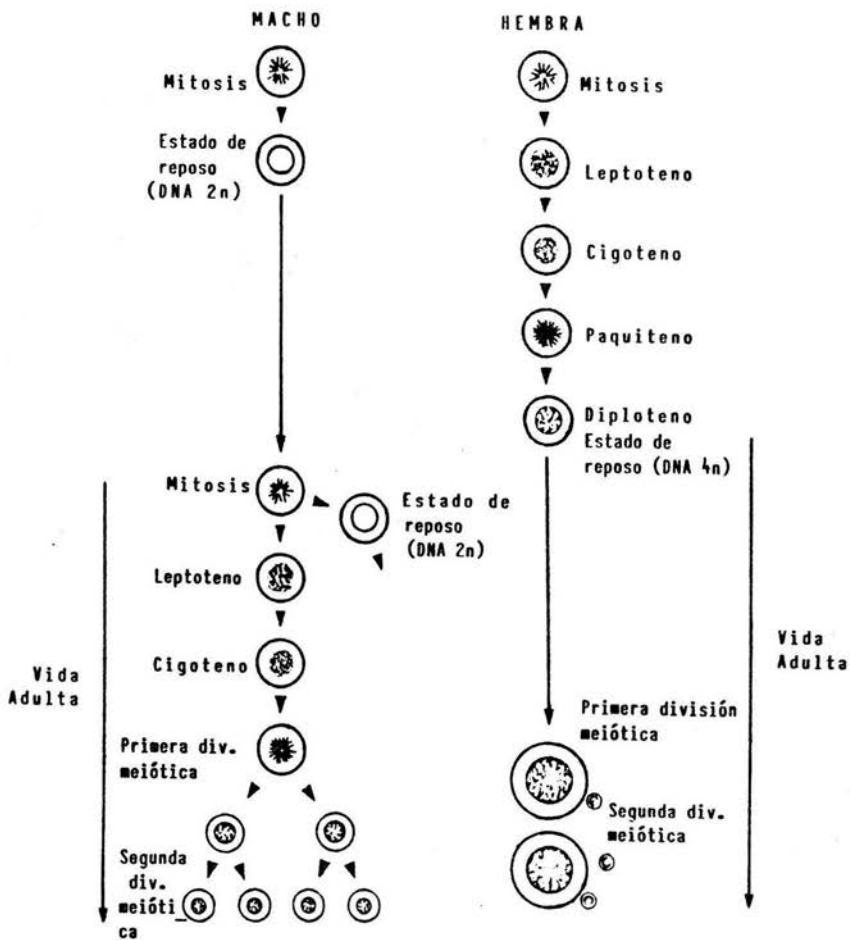


Fig. 1. Origen de los gametos masculino y femenino de mamíferos. La diferencia más notable entre ambos sexos es la etapa ontogénica del organismo en la que las células proliferan. Tomado de Byskov, 1982.

fuera a entrar en una nueva mitosis, pero en lugar de hacerlo, entra en el leptoteno de la primera división reduccional, en la cual se llevará a cabo el entrecruzamiento cromosómico. Una vez concluida esta primera división, el producto resultante son dos espermatocitos secundarios, cada uno de los cuales tiene un juego de cromosomas homólogos duplicados y recombinados. La vida del espermatocito secundario es muy breve ya que pronto vuelve a entrar en una división meiótica, donde las cromátidas hermanas de cada homólogo (que se habían mantenido unidas desde la duplicación del DNA), se separan, resultando de este proceso dos espermátidas haploides (*op. cit.*).

El desarrollo de la espermátida hasta espermatozoide se conoce como espermiogénesis, espermiogénesis o espermioteleosis (Baccetti, 1985) (Fig. 2). Este proceso consiste básicamente en una reestructuración de la espermátida, la cual pasa de ser una célula redonda y grande en una de tamaño considerablemente menor y con un aparato que le confiere motilidad. Entre los cambios más notables que ocurren en la espermiogénesis están la hipercondensación que sufre el DNA, y que ocasiona que el núcleo espermático sea muy pequeño en comparación con el somático; la formación del acrosoma en la parte anterior de la cabeza, a partir de vesículas ricas en enzimas hidrolíticas originadas en el aparato de Golgi; hacia la región posterior hay una migración de los centriolos, los cuales inician la formación del axonema. Las mitocondrias de la espermátida se acomodan alrededor de la pieza media del flagelo

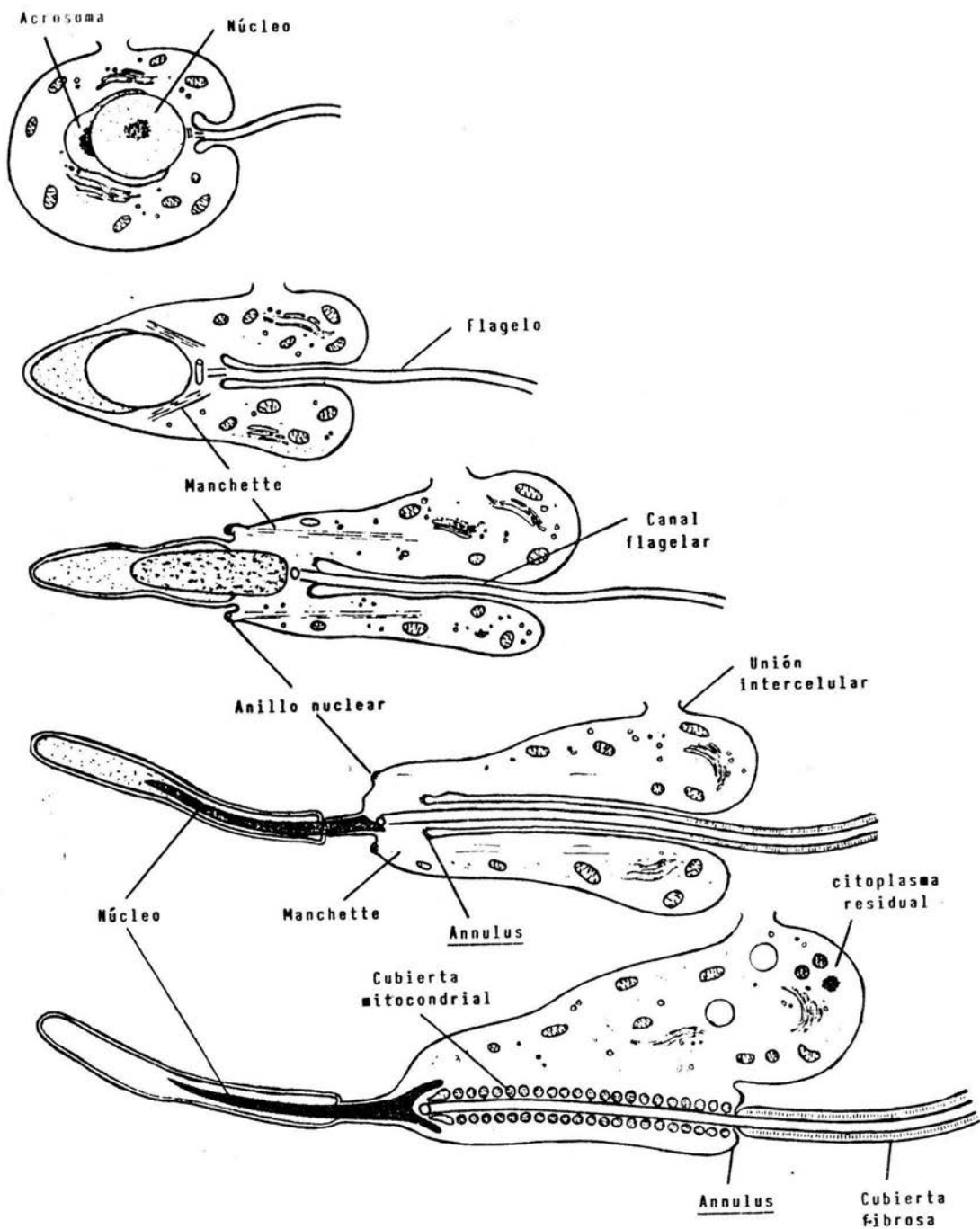


Fig. 2. Desarrollo de una espermatida de cuyo . Tomado de Setchell, 1982.

(la región más cercana a la cabeza), rodeándola casi siempre en un arreglo helicoidal y con un número de vueltas constante para cada especie (Setchell, 1982). Finalmente, algunos organelos como el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi desaparecen; también hay una eliminación del citoplasma sobrante, quedando un residuo, la gota citoplásmica (Fig. 2). El producto de la espermiogénesis es una célula que contiene sólo lo indispensable para cumplir su función, que es la de depositar el material genético masculino en el óvulo durante la fertilización.

ESTRUCTURA DEL ESPERMATOZOIDE

En cuanto a su estructura, puede considerarse que el espermatozoide tiene dos partes principales, la cabeza y el flagelo o cola. La membrana plasmática rodea a la célula en su totalidad. A continuación se describe cada una de estas partes.

I. Cabeza

La cabeza espermática está formada por el núcleo, el acrosoma, una reducida cantidad de citoplasma y algunos componentes del citoesqueleto. Como ya se mencionó, en la cabeza espermática la mayor parte del volumen es ocupada por el núcleo, el cual tiene un tamaño reducido por estar altamente deshidratado

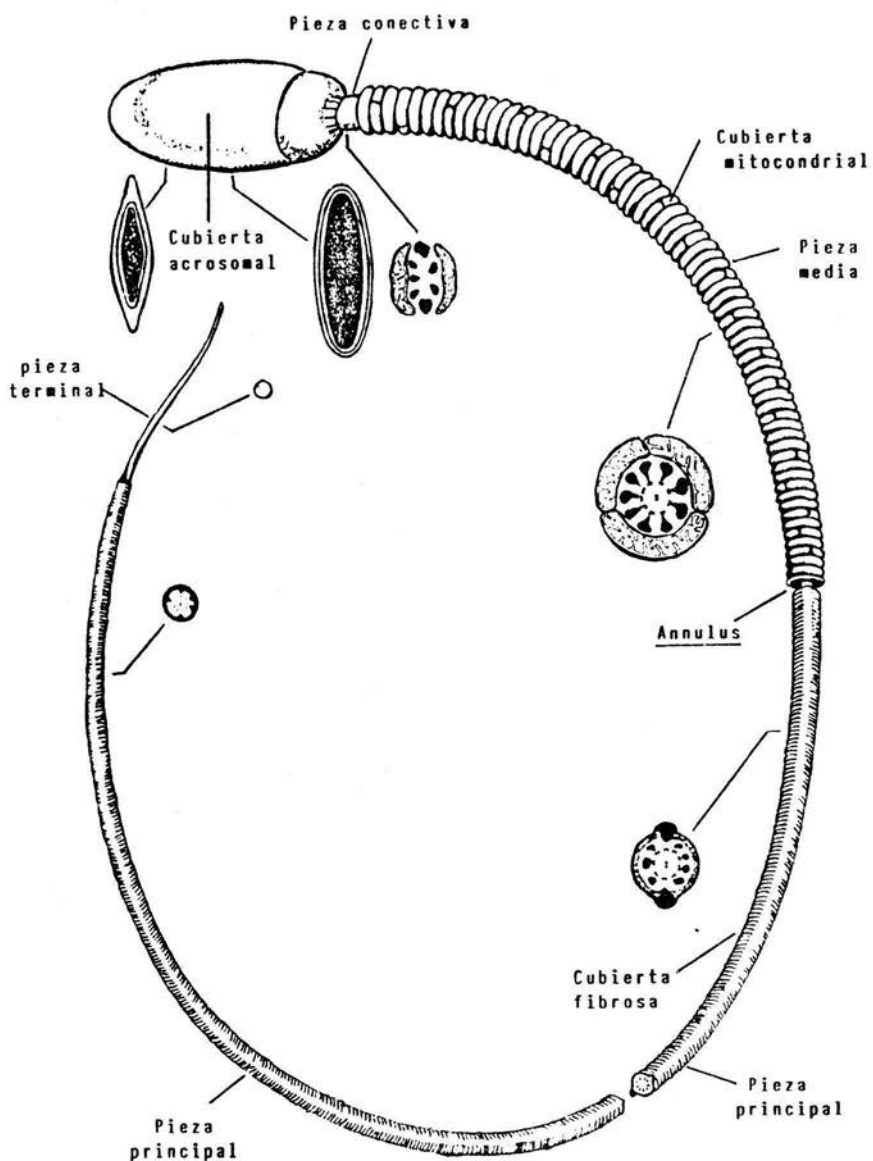


Fig. 3. Estructura del espermatozoide de mamíferos. Los cortes transversales muestran la composición y el arreglo interno de la célula en sus diferentes segmentos. Tomado de Setchell, 1982.

(Baccetti, 1985) y por la presencia de las protaminas, que estabilizan al DNA por medio de puentes disulfuro e interacciones iónicas (Eddy, 1988; Reyes *et al.* 1976). El material genético del espermatozoide se caracteriza por ser muy semejante al de las células somáticas pero transcripcionalmente inactivo (Mann y Lutwak-Mann, 1981), además de estar cubierto por una envoltura nuclear singular, ya que prácticamente carece de poros, salvo en algunas regiones específicas (Eddy, 1988; Baccetti, 1985).

En el acrosoma (Fig. 4b) se encuentran las enzimas necesarias para penetrar al óvulo en el momento de la fecundación. Entre las principales enzimas acrosomales que intervienen en la interacción óvulo-espermatozoide están la hialuronidasa, que es responsable de la dispersión de las células del *cumulus oophorus* y la acrosina, que es una enzima proteolítica muy similar a la tripsina y que no sólo participa en la penetración de las envolturas del óvulo, sino que al parecer también tiene que ver con la penetración del espermatozoide en el moco cervical (Dunbar y Wolgemuth, 1984; Nelson, 1985).

II Flagelo.

El flagelo es la parte más grande del espermatozoide y tiene como función permitir a éste el desplazamiento. Para su estudio, el flagelo espermático ha sido dividido en cuatro regiones o

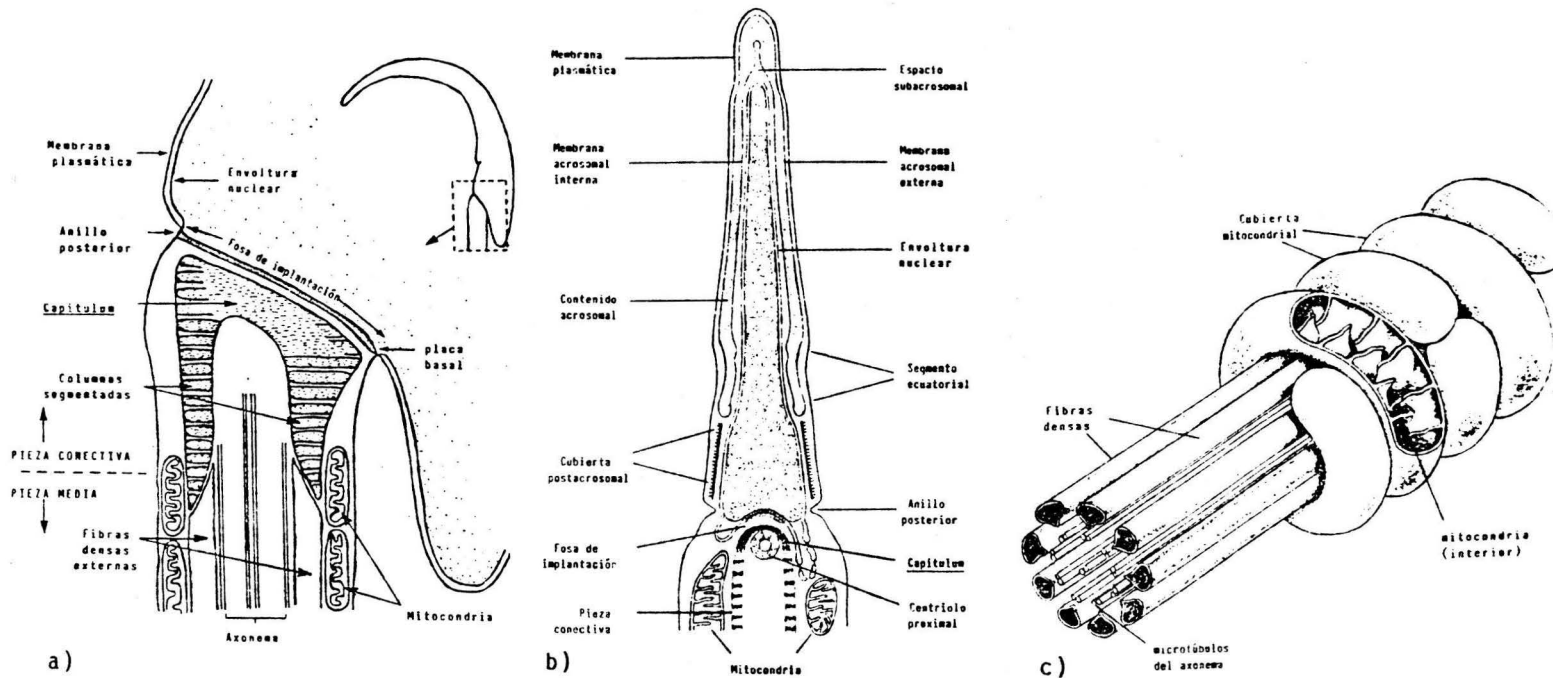


Fig. 4. Subestructura del espermatozoide; a) unión de las piezas conectiva y media en el espermatozoide de la rata (tomado de Eddy, 1988), b) cabeza de un espermatozoide de primate (tomado de Setchell, 1982) y c) cubierta mitocondrial y axonema espermático (tomado de Setchell, 1982).

segmentos: las piezas conectiva, media, principal y terminal (Cap. cit.; Setchell, 1982) (Fig. 3). La pieza conectiva es el sitio donde se une la cabeza con el flagelo, en la pieza media, el axonema se encuentra rodeado por la cubierta mitocondrial (Fig. 4c); la pieza principal, que es el segmento más largo del flagelo y el que tiene la mayor participación en el proceso de motilidad, está protegido por una cubierta fibrosa formada por dos columnas longitudinales, colocadas en polos opuestos, y que son denominadas dorsal y ventral. Finalmente, la pieza terminal está libre de la cubierta fibrosa y consiste únicamente en el axonema cubierto por la membrana plasmática. Internamente, el axonema tiene la misma estructura conocida como sistema 9+2 (Fig. 5). Entre el axonema y las cubiertas mitocondrial y fibrosa hay 9 fibras densas, cada una de las cuales corresponde a un par de microtúbulos; por la presencia de estas fibras, para algunos autores el sistema de componentes del axonema es 9+9+2 (Cardullo y Cone, 1986). Estas fibras se extienden a lo largo de la pieza media y parte de la principal.

III Membrana

Aparentemente la estructura de la membrana espermática sigue el modelo del mosaico fluido transmembranal de otras células; presenta tres diferentes partes: un glicocáliz externo, formado por glicolípidos cargados y residuos de glicoproteínas con cadenas de

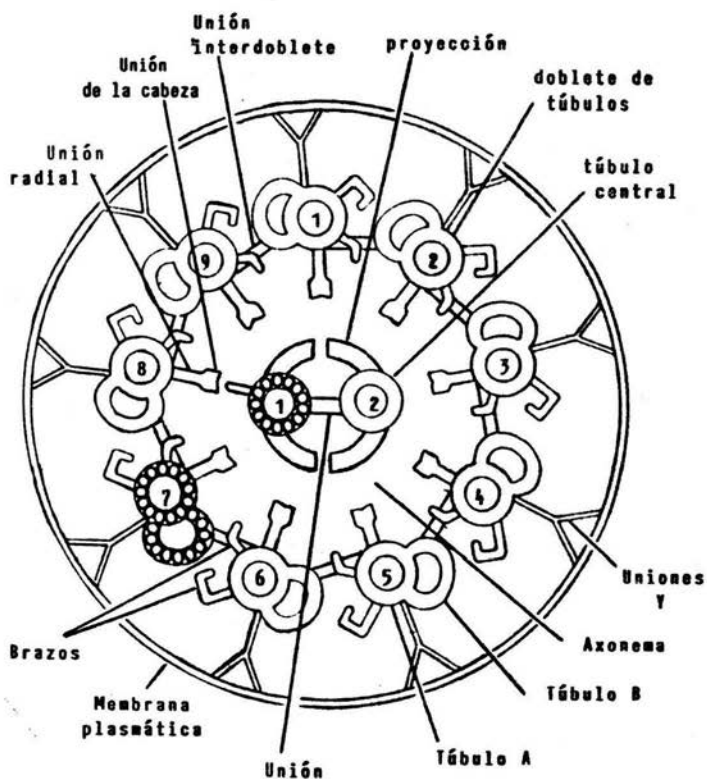


Fig. 5. Corte transversal del axonema espermático. La estructura muestra el arreglo 9 + 2, que es típico de los flagelos de las células eucariotes. Tomado de Baccetti, 1985.

oligosacáridos, y una matriz membranal con proteínas embebidas dentro de la bicapa lipídica (Mann y Lutwak-Mann, 1981). Del total de los lípidos que componen la matriz membranal, el 70% son fosfolípidos y en menor proporción se encuentran otros tipos de grasas. En lo referente a la cantidad de proteínas estructurales, se ha observado que están casi en la misma proporción que los lípidos, si bien hay variaciones dependiendo de la región de la célula o del estado fisiológico (Eddy, 1988).

Otra característica importante de la membrana espermática es la de tener diferentes dominios de superficie, que actúan con funciones específicas, por ejemplo, de reconocimiento. En este sentido, la membrana espermática es un verdadero mosaico, lo que puede dar idea de la alta especialización de cada parte del gameto. Los dominios espermáticos se ven modificados durante las diferentes fases de la vida de la célula; esta serie de cambios tienen por objetivo que en el momento de la fertilización los gametos de la misma especie sean capaces de reconocerse (Shalgi, *et al.*, 1986).

METABOLISMO ESPERMÁTICO

El espermatozoide presenta cambios en el metabolismo conforme pasa por las diferentes etapas de su vida. Durante la estancia del espermatozoide en el testículo la energía es obtenida tanto de reservas internas como de sustancias presentes en el plasma

testicular. La vía más utilizada en esta etapa es la oxidativa y las sustancias aparentemente preferidas son algunos lípidos sobre todo fosfolípidos y ácidos grasos libres (*op. cit.*; Brooks, *et al.*, 1974; Garbers y Kopf, 1980). En el epidídimo, durante el proceso de maduración (que es la serie de cambios que le suceden al gameto durante su viaje por la cabeza, cuerpo y cauda epididimales; Hinrichsen-Kohane, *et al.*, 1984) , el espermatozoide continúa con un metabolismo oxidativo de lípidos. Este metabolismo ha mostrado ser, al igual que en otras células, dependiente de la presencia de carnitina, la cual es abundante en el plasma epididimal. Además de su función en la acetilación de lípidos para su posterior oxidación, la carnitina permite el almacén de grupos acetilo, y por lo tanto, funciona como reguladora de los niveles de acetil-CoA (Brooks, *et al.*, 1974); por otra parte, se ha visto que actúa diferencialmente como estimulante o inhibidor de la respiración, y que tiene efecto sobre el transporte de Ca^{++} (Deana, *et al.*, 1989).

La presencia de mayores cantidades de carnitina en la cauda en comparación con la cabeza y el cuerpo epididimales, podría hacer pensar que el metabolismo del espermatozoide maduro se perfila como lipolítico, sin embargo, la célula eyaculada es considerada en general como preferentemente glicolítica, salvo en algunas especies. El espermatozoide contiene todas las enzimas necesarias para la degradación de carbohidratos desde que se encuentra en el epidídimo; esto ha sido demostrado en los

experimentos en los cuales, bajo condiciones *in vitro*, las células obtenidas de las diferentes regiones del epidídimo son capaces de utilizar la glucosa. Esta capacidad de metabolizar carbohidratos es mayor en las células de la cauda, tanto en presencia como en ausencia de oxígeno (Frenkel, *et al.*, 1973a y 1973b). El hecho de que el metabolismo de azúcares sea escaso en el epidídimo se debe a que en esta región se carece de tales sustratos, y si bien se ha encontrado ácido láctico, se cree que es producido en eventos extraespermáticos.

El contacto del espermatozoide con los carbohidratos tiene lugar durante la eyaculación, en la cual los gametos se diluyen con el semen, que tiene elevadas cantidades de fructosa; en algunas especies como la rata y el cuyo, hay además la presencia de glucosa, que es aportada por la glándula coagulante y la vesícula seminal, respectivamente (Mann y Lutwak-Mann, 1981). Estas dos hexosas, junto con la manosa, son las moléculas preferidas por la mayoría de los espermatozoides y su utilización depende de la disponibilidad o de la preferencia de la especie; por ejemplo, los del toro, carnero y del ser humano son especies fructolíticas (*op.cit.*), mientras que la rata puede utilizar tanto glucosa como fructosa, pero prefiere a la primera (Leese, *et al.*, 1981), la cual le es además indispensable para fertilizar (Niwa e Iritani, 1978).

Además de los sustratos mencionados, tanto en el semen como en los fluidos genitales de la hembra existen otros

sustratos susceptibles de ser aprovechados por el espermatozoide; por ejemplo, el piruvato y el lactato o bien algunos ácidos grasos libres, que son utilizados por especies que conservan su metabolismo lipolítico. Los sustratos son procesados por la vía anaerobia y/o por la oxidativa (esto depende de la naturaleza de los mismos y de las condiciones ambientales); en relación a estas vías, el espermatozoide es una célula peculiar ya que en comparación con las células somáticas, no sólo tiene una baja tasa del efecto Pasteur (inhibición del consumo de azúcar en presencia de oxígeno), sino que además algunas especies muestran el efecto Crabtree, que es exactamente lo opuesto, y el cual es típico de las células tumorales (Fraser y Ahuja, 1988). En la fase anaerobia, el espermatozoide utiliza las hexosas para producir, ya sea por glucólisis o por fructólisis, dos moléculas de ácido láctico, las cuales en condiciones aerobias pueden ser introducidas en el Ciclo de Krebs o en algunos casos, utilizadas para la síntesis de aminoácidos o de ácidos orgánicos (Mann y Lutwak-Mann, 1981).

Durante la fase oxidativa, además de las moléculas de lactato provenientes de la vía glicolítica, también pueden metabolizarse otras moléculas como acetato, sorbitol, glicerol y algunos aminoácidos. La capacidad para utilizar tales sustratos es presentada sólo por algunas especies (*op. cit.*).

Como se mencionó al principio, el espermatozoide sufre cambios en su metabolismo al pasar por diferentes etapas. En el caso del

gameto eyaculado, al ser depositado en el tracto reproductor femenino, inicia el proceso denominado capacitación. Este consiste en una serie de cambios que tienen como consecuencia final la reacción acrosomal y la motilidad hiperactivada (Bavister, 1980; Bedford, 1983 y Hinrichsen-Kohane, *et al.* 1984). La capacitación es indispensable para que el espermatozoide pueda fecundar al óvulo. Entre los principales eventos de la capacitación, están: decrecimiento en la carga neta negativa de la membrana espermática, remoción de factores epididimales y seminales unidos a la membrana, cambios en la tasa de respiración, modificación en los antígenos de superficie, cambios en la permeabilidad membranal e incremento en el influjo de iones calcio (Farooqui, 1983) y disminución en la relación colesterol/fosfolípidos (Davies, 1979,1980), entre otros. Como se puede observar, este proceso, que además tiene un periodo de duración especie-dependiente (Hunter, 1983), involucra en parte algunos aspectos del metabolismo de la célula. Puede considerarse que el proceso de capacitación se inicia en el momento que tiene lugar la cópula, o bien, en condiciones *in vitro*, cuando células maduras (de la cauda epididimal, de los conductos deferentes o eyaculadas) son puestas en contacto con un medio de incubación apropiado (Dukelow, 1971; Yanagimachi, 1980).

Retomando lo referente al metabolismo durante la capacitación, se ha observado que en general hay un incremento en el consumo de sustratos y de oxígeno (Yanagimachi, 1988). No

obstante, los sustratos tienen diferente efecto en las especies: el espermatozoide del ratón requiere de un sustrato glicolizable para sostener los cambios propios de la capacitación; si el gameto es preincubado en un medio libre de sustratos y posteriormente se le añade glucosa, tiene la misma capacidad fertilizadora que las células incubadas continuamente con la hexosa, pero si ésta no es añadida, no puede expresarse ni la reacción acrosomal ni la movilidad hiperactivada (Fraser y Herod, 1990). El gameto del toro es capaz de metabolizar glucosa tanto en condiciones aerobias como anaerobias, pero la respiración es mayor en ausencia del azúcar (en Campos, 1986). En el cayo, la presencia de la glucosa durante la incubación ocasiona un retardo en la reacción acrosomal (Rogers y Yanagimachi, 1975). Mújica y Valdés en 1983 determinaron que el efecto retardador de la glucosa se da durante la reacción acrosomal, mientras que otros autores plantean que el retardo se efectúa durante la capacitación, y que la causa es la baja eficiencia metabólica, ocasionada a su vez por el efecto Crabtree (Rogers, *et al.*, 1979). Independientemente de las peculiaridades del metabolismo de cada especie, lo que parece ser común es el incremento de éste durante el proceso capacitante, ya que se requieren grandes cantidades de ATP para sostener la movilidad hiperactivada, así como la reacción acrosomal. Es importante, sin embargo, citar lo propuesto por Boell en 1985, quien al medir el consumo de oxígeno del espermatozoide de ratón a lo largo del proceso capacitante, encontró que sólo durante

el inicio de la incubación hubo un incremento pero que después se mantuvo constante; el autor plantea que la elevación inicial en el consumo se debe a la disponibilidad de sustratos exógenos y que el metabolismo no se acelera durante la capacitación.

En lo referente al control del metabolismo espermático, debe hablarse inicialmente del aparato enzimático que posee la célula, el cual permite modular la velocidad de algunas reacciones; entre las enzimas que juegan este papel están la fosfofructocinasa (que es la principal reguladora de la fase anaerobia), la hexocinasa, la fosfoglicerato cinasa y la lactato deshidrogenasa. Esta última, que es llamada LDH-X o C₄ es la isoenzima más activa de todas las conocidas y es específica para el espermatozoide. Las enzimas glicolíticas son singulares, ya que para la mayoría de ellas, un alto porcentaje se localiza en el interior de la mitocondria, mientras que el resto tiene una ubicación citosólica o membranal (Mann y Lutwak-Mann, 1981).

Por otra parte, se considera que es precisamente en la mitocondria en donde se produce la principal regulación metabólica; hasta el momento se ha establecido que el balance energético del espermatozoide está dado por la relación ATP/ADP, que es conocida como carga energética de adenilato. La carga energética (EC) es igual a la siguiente ecuación :

$$EC = \frac{ATP + 1/2 ADP}{ATP + ADP + AMP}$$

(Frenkel, *et al.*, 1973b)

Para mantener una adecuada carga energética, el gameto modula su metabolismo. Aparentemente el metabolismo de sustratos por la vía oxidativa tendría ventajas sobre la glicólisis, dado que en el primero se obtiene un mayor rendimiento de moléculas de ATP, además de presentar una menor dependencia de los sustratos exógenos, ya que este metabolismo puede ser endógeno; sin embargo, el hecho de que algunos espermatozoides presenten el efecto Crabtree, resta claridad al razonamiento inicial.

Finalmente, otros factores que inciden en la regulación del metabolismo, son, la movilidad (que gasta grandes cantidades de ATP; Hammerstedt, *et al.*, 1988) y algunos factores ambientales como la concentración de células, el pH y la presencia de algunos iones (Tash y Means, 1983; Carr y Acott, 1989; Stock y Fraser, 1989 y Okamura, *et al.*, 1985).

MOVILIDAD ESPERMÁTICA.

El espermatozoide adquiere la capacidad de motilidad durante el proceso de maduración (en Iso, W-W, *et al.*, 1987; Usselman y Cone, 1983; Cornwall, *et al.*, 1986). Durante su estancia en el epidídimo, el gameto de algunas especies comienza a moverse; pero en otras como la rata, el hámster y el ratón, es necesario que llegue el momento de la eyaculación para que esta capacidad se manifieste (en Chulavatnatol, 1982). Un factor que contribuye a la inmovilización del espermatozoide en el epidídimo es la elevada

osmolaridad presente en el plasma epididimal; en la rata se ha encontrado una glicoproteína de elevado peso molecular (más de 200 K), que ha sido denominada "inmovilina", cuyas propiedades reológicas son capaces de mantener a las células sin movimiento alguno (Usselman y Cone, 1983).

Los factores externos que permiten al espermatozoide iniciar su movilidad son diversos. En alguna literatura se considera que el simple efecto de dilución permite la movilidad celular, ya que se eliminan de la superficie del gameto algunos factores inhibitorios (como podría considerarse a la inmovilina y al ión potasio; Morisawa, 1985), además de que las células se separan, teniendo una mayor disposición del oxígeno y los sustratos del medio (Turner, *et al.*, 1978). Otros autores consideran que la iniciación de la movilidad depende de factores más relacionados con el metabolismo del espermatozoide. Tso, W-W, *et al.* en 1987 concluyeron que la simple dilución no es suficiente para que el espermatozoide de la rata pueda iniciar la movilidad, y que es necesaria la presencia de algunos azúcares (no necesariamente metabolizables). Finalmente, algunos otros consideran que para algunos gametos no es necesaria ninguna condición externa especial para que la movilidad inicie (Chulavatnatol, 1982; Usselman y Cone, 1983).

Papel del AMPc en la movilidad espermática.

En 1971, Garbers y colaboradores observaron que el AMPc tenía un efecto regulador (estimulador) sobre el metabolismo y la movilidad del espermatozoide de bovino. Al tener a las células incubadas en presencia de un análogo permeable del AMPc, el dibutiril AMPc (dbAMPc) o de inhibidores de la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos como la cafeína y la papaverina, la movilidad y la respiración celular se incrementaban. Aunque ellos reportan que el efecto era ocasional, lo cual indicaba variaciones en la permeabilidad de la membrana hacia el análogo y los inhibidores, estudios realizados posteriormente en esa misma y en otras especies, confirmaron los resultados y actualmente se considera que el papel del AMPc en la movilidad es universal para el gameto de varios grupos, entre ellos los mamíferos.

El espermatozoide cuenta con todos los elementos del sistema denominado "segundo mensajero". Tiene la enzima que cataliza la síntesis del AMPc a partir de ATP, la adenilato ciclasa; sin embargo esta enzima, a diferencia de la que se presenta en las células somáticas, no es estimulada por ninguna hormona, ni por fluoruro o toxinas bacterianas. Otras diferencias importantes con respecto a la enzima somática es que ésta se estimula con Mg^{++} , mientras que la espermática lo hace con Mn^{++} , y que además ésta última es más abundante (Hoskins y Casillas, 1975). Estudios más recientes indican que la adenilato ciclasa espermática carece de

sus subunidades estimuladora e inhibidora (Hildebrant, *et al.*, 1985). Los otros componentes del sistema presentes en el espermatozoide son: el propio AMPc, las proteínas cinasas dependientes de AMPc, la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos y las fosfatasas de fosfoproteínas (Garbers y Kopf, 1980).

Se ha observado una elevación de los niveles del AMPc intraespermático durante la iniciación de la movilidad. Esto se ha determinado en ratón (Stein y Fraser, 1984), hámster y jabalí (Ishida, *et al.*, 1987) y toro (Cascieri, *et al.*, 1976). Para dilucidar el efecto del AMPc sobre el aparato mótil, se han trabajado modelos desmembrados, en los que el axonema es puesto en contacto con el nucleótido cíclico en presencia de ATP; los resultados obtenidos muestran que bajo tales condiciones experimentales la movilidad se presenta (en Ishida, *et al.*, 1987; Tash y Means, 1982). Con estos experimentos se ha determinado que el efecto del AMPc sobre la movilidad se da en forma directa sobre el axonema; el mecanismo es por la fosforilación de proteínas mediada por cinasas dependientes de AMPc, y en ella intervienen también el calcio, la calmodulina (Tash y Means, 1987) y la calsemina (Nelson, 1985).

La maquinaria enzimática que hace posible la movilidad se encuentra en el flagelo; en el espermatozoide de la rata se ha observado la presencia de una ATPasa flagelar, ubicada en el axonema y entre éste y las fibras densas (Nagano, 1965); también se encontró una proteína cinasa dependiente de AMPc (Horowitz, *et*

al., 1984 y 1988). Se ha planteado la presencia de proteínas cinasas dependientes de AMPc en la parte externa de la membrana espermática, sin embargo, la existencia de estas proteínas (denominada ectocinasas) está en discusión (Noland, *et al.*, 1986).

La relación entre el metabolismo y el AMPc no es tan clara como lo es la del nucleótido con el inicio de la movilidad. De acuerdo con lo encontrado por Garbers y colaboradores en 1971, la secuencia de eventos al añadir inhibidores de fosfodiesterasa es: elevación del AMPc basal, inducción de la movilidad, incremento en los requerimientos energéticos de la célula, disminución en la reserva de ATP y por tanto en el valor de la carga energética y, finalmente, un incremento en el metabolismo (Hoskins y Casillas, 1975). En el espermatozoide de bovino, Cascieri y colaboradores (1976) observaron que hay un incremento en el consumo de glucosa cuando las células son incubadas con teofilina. Sin embargo, en el caso del espermatozoide de la rata, al ser incubado con cafeína no presentó modificación en el consumo de oxígeno ni en la capacidad fertilizadora (Paz-Frenkel, *et al.*, 1978).

Otro factor que tiene incidencia sobre la movilidad es la presencia de algunos iones en el medio de incubación. Como se mencionó anteriormente, el calcio es un ión importante no sólo para modular la movilidad espermática sino también para que el gameto pueda sufrir la reacción acrosomal. El calcio tiene también un efecto estimulador en la actividad de la adenilato

ciclasa (en Garbers y Kopf, 1980). En esta parte es necesario aclarar que el calcio puede tener diferentes efectos dependiendo de su carácter de externo o interno a la célula. La presencia de calcio externo es considerada como necesaria para que la movilidad se inicie en algunas especies, mientras que en otras puede no ser necesaria o inclusive ser inhibidora del proceso cuando se encuentra en determinadas concentraciones. Es al calcio interno al que se le atribuye la función de intervenir en la forma de ondulación del flagelo (Tash y Means, 1983; Lindemann, *et al.*, 1987). En el transporte del calcio participan algunos neurotransmisores como la acetilcolina, la cual tiene un efecto similar al de los ionóforos (Nelson, *et al.*, 1982). Otro ión que aparentemente afecta la movilidad espermática es el bicarbonato, el cual estimula a la adenilato ciclasa (Okamura, *et al.*, 1985; Tajima, *et al.*, 1987). Por último, el pH también tiene participación al regular la fosforilación de algunas fosfoproteínas (Carr y Acott, 1989).

La movilidad del espermatozoide puede presentar diferentes patrones. De éstos, el más importante es el expresado al finalizar la capacitación; a esta forma de flagelación se le denomina "hiperactivada" y se caracteriza porque el flagelo tiene una flexibilidad muy pronunciada y bate de una manera enérgica, haciendo una figura similar a un 8 (Fraser, 1977; Pusch, 1987; Morales *et al.*, 1988). La función biológica de la movilidad hiperactivada es la de proporcionar la fuerza suficiente para que

el espermatozoide sea capaz de penetrar al óvulo ya que en ese momento también se está llevando a cabo la reacción acrosomal, con la consecuente liberación de enzimas hidrolíticas (en Fraser, 1977).

ANTECEDENTES

Los estudios realizados para dilucidar el papel de la glucosa en el metabolismo del espermatozoide de los mamíferos han mostrado que el carbohidrato es utilizado de diferente manera por las especies estudiadas. En el caso del espermatozoide de la rata, los estudios pioneros de fertilización *in vitro* realizados por Toyoda y Chang en 1974 demostraron que el gameto lograba capacitarse y fertilizar óvulos de la misma especie al ser incubado en presencia de piruvato, lactato y glucosa. Posteriormente, Tsunoda y Chang evaluaron el efecto de diferentes sustratos en la fertilización *in vitro* de la rata. Observaron que la fertilización no pudo llevarse a cabo en ausencia de sustratos, y que el piruvato no era indispensable para la fecundación. Al probar solos o combinar los sustratos encontraron lo siguiente: los espermatozoides incubados con uno de los sustratos a la vez fueron incapaces de fertilizar. La combinación de piruvato-lactato

tuvo un 0% de fertilización; la de glucosa-piruvato, un 6%; glucosa-lactato, 60% y finalmente piruvato-lactato-glucosa, 81-83 por ciento. De estos resultados infieren que la glucosa y el lactato son necesarios y que el piruvato puede ser sustituido por células foliculares. Ellos también reportan que no observaron diferencias en la movilidad de las células incubadas en cada uno de los sustratos (Tsunoda y Chang, 1975). Niwa e Iritani complementaron este trabajo en 1978. Ellos valoraron la necesidad de la presencia de varias hexosas para que la fertilización pudiera llevarse a cabo. Encontraron que la glucosa es indispensable para la fecundación, y que no puede ser sustituida por la fructosa o la galactosa pero sí por la manosa, aunque con menor eficacia. Plantean que la glucosa es necesaria durante la penetración de los óvulos, probablemente para la reacción acrosomal, ya que en la capacitación puede estar ausente y ser sustituida por la galactosa o la manosa, pero no por la fructosa. De los estudios anteriores se concluye que la glucosa es indispensable en alguna fase del proceso capacitante en el espermatozoide de la rata. Esto es congruente con las condiciones naturales en las que el gameto se capacita, ya que en el tracto reproductor femenino de la rata hay un aporte constante de glucosa y fructosa, pero la primera es consumida en forma preferencial por el espermatozoide (Leese. *et al.*, 1981). En este trabajo los autores sugieren que la glucosa consumida es procesada por la vía anaerobia, aunque tal suposición se basa en

cálculos teóricos.

Por otra parte, en el espermatozoide del cuyo la glucosa juega un papel poco claro hasta el momento. Rogers y colaboradores en 1979, publicaron resultados en los que determinaron que la glucosa causa el efecto Crabtree en el gameto, además de causarle un retardo en la expresión de la reacción acrosomal (R.A.). Ellos explican el fenómeno diciendo que la inhibición en la R.A. es causada porque el efecto Crabtree retarda la aceleración metabólica para la fase final de la capacitación. Por tanto, ellos consideran que el efecto nocivo de la glucosa se presenta durante la capacitación. Contrario a lo anterior, Mújica y Valdés en 1983 determinaron que el efecto inhibitorio de la glucosa se presenta solamente durante la R.A. Probaron lo anterior al capacitar a los gametos en presencia de la hexosa para después transferirlos a un medio sin glucosa; ellos observaron que la R.A. se presentaba inmediatamente después de la transferencia.

Otros efectos de la glucosa sobre el espermatozoide del cuyo han sido determinados por Mújica y colaboradores (1991). Ellos han observado que en los gametos incubados con piruvato y lactato, la presencia de la hexosa causa un patrón de movilidad típico, que se caracteriza por ser vibratorio y muy vigoroso. En este tipo de movilidad el flagelo se flexiona muy poco y además el gameto presenta una mayor direccionalidad. Otro efecto de la glucosa en el espermatozoide del cuyo es que causa una elevación adicional en el contenido de AMPc durante los

primeros segundos de la incubación; esta elevación no ha sido reportada para otra especie y su significado biológico tampoco es muy claro.

Tomando en cuenta que la glucosa puede tener efectos contrarios aún en especies cercanas como el cuyo y la rata (ambos son roedores), y que en la literatura no se citan trabajos similares a los realizados en el cuyo pero para la rata, que permitan esclarecer el efecto de la glucosa en el espermatozoide de esta especie, en el presente trabajo se plantearon los siguientes

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Conocer el efecto de la glucosa sobre algunos aspectos del metabolismo y sobre la movilidad del espermatozoide de la rata durante el inicio de la incubación capacitante.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar si la glucosa promueve algún efecto sobre el patrón de movilidad espermático.

2. Establecer el tiempo en que el espermatozoide adquiere la movilidad progresiva.
3. Valorar el nivel basal de AMPc intraespermático , así como la cinética del contenido del nucleótido durante los primeros momentos de la incubación capacitante.
4. Observar si la glucosa tiene algún efecto en el comportamiento de los niveles de AMPc intraespermático.
5. Cuantificar la cinética del contenido de ATP intraespermático durante el inicio de la incubación.
6. Verificar si la glucosa afecta los niveles de ATP al inicio de la incubación.
7. Determinar si la glucosa ejerce algún efecto en el consumo de oxígeno del espermatozoide.

METODOLOGIA

Para la realización de este trabajo se utilizaron solamente reactivos de grado analítico.

OBTENCION DE LOS ESPERMATOZOIDES

Se trabajó con ratas albinas de la raza Wistar obtenidas del bioterio del CINVESTAV. Los animales fueron mantenidos con un fotoperiodo de 12 h luz-12 h oscuridad y con disposición de agua y alimento *ad libitum*. Se utilizaron sólo organismos adultos que presentaran un peso mínimo de 300 g. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical o por la inhalación prolongada de cloroformo (ambos métodos se emplearon indistintamente). Después del sacrificio se rasuró la parte baja del abdomen y se hizo una incisión en plano transversal por la cual se extrajeron los testículos con sus epidídimos y vasos deferentes; en la parte distal de cada uno de éstos se había practicado previamente una atadura para evitar la pérdida de espermatozoides. Los órganos se colocaron de inmediato en una solución de NaCl 154 mM (solución salina), dentro de un baño de incubación a 37°C. Para evitar cualquier posible contaminación con otros tipos celulares, antes de extraer las muestras espermáticas se limpió a cada epidídimo del tejido graso y los capilares que le rodeaban.

La extracción de los espermatozoides se llevó a cabo rompiendo la cápsula del epidídimo y desenrollando los túbulos seminíferos de la región de la cauda hasta tener un solo conducto, el cual fue presionado para obtener el contenido epididimal, que iba siendo recolectado con una pipeta. Se tomó parte de la muestra obtenida de cada conducto, se suspendió en solución salina y se observó al microscopio para descartar aquellas muestras que no tuviesen movilidad en por lo menos el 70% de la población espermática (porcentaje estimado). Una vez seleccionadas las muestras útiles, fueron mezcladas y suspendidas en solución salina; el volumen dependió del tipo de experimento a realizar.

EVALUACION DEL NUMERO DE ESPERMATOZOIDES

Se construyó una curva patrón de espermatozoides para poder relacionar cuantitativamente los metabolitos determinados durante los experimentos y el número de células del que fueron extraídos. Se eligió el método de interpolación en una curva por tener mayor precisión que el de conteo en hemocitómetro.

Para la realización de la curva se suspendió la muestra de cada cauda epididimal en 2 ml de solución salina, se reunieron todas las células y se centrifugaron a 2500 rpm durante 4 min; el sobrenadante (SN) fue desechado y la pastilla resuspendida por agitación en vórtex en el mismo volumen de solución salina. Se

tomaron 50 μ l de la suspensión y se diluyeron con 1 ml de Tritón X-100 al 1%, esta muestra fue contada en hemocitómetro por lo menos un par de veces por dos personas. Por medio de la fórmula:

$$\frac{\# \text{ de células } \bar{X}}{\text{de los conteos}} \times 10^5 \times 10^{-4} = \text{millones de células/ml}$$

se calculó la concentración de espermatozoides. A partir de esta muestra (suspensión madre) se hicieron varias diluciones con solución salina, en un volumen final de 4 ml, teniendo un número esperado de células para cada dilución. De cada una de éstas se tomaron, bajo agitación constante, 3 alícuotas de 1 ml cada una, las cuales fueron centrifugadas durante 10 min en una microcentrífuga Eppendorf; se desecharon 900 μ l de SN, y a la pastilla disgregada se le añadieron 150 μ l de ditiotreitól (DTT) 90 mM en Tris 50 mM, pH 9.0, después de 30 min se agregaron 200 μ l de agua bidestilada desionizada y 200 μ l de SDS al 10%; se sonicó cada muestra durante 30 seg y se tomaron 25 μ l, los que se diluyeron con 1 ml de amortiguador salino de fosfatos (PBS; Na_2HPO_4 5.56 mM, KH_2PO_4 4.26 mM, NaCl 132.44 mM, pH 7.2) finalmente se leyó la absorbencia a 260 nm (método modificado del reportado por Moreno en 1985).

Por otra parte, de cada dilución se tomaron cinco alícuotas de 50 μ l a las que se les determinó el número de células por conteo como se describió previamente. Para la construcción de la curva se graficó la media del número de células de cada dilución

contra su absorbencia promedio. La curva fue elaborada en el rango de 0 a 30 millones de espermatozoides y tuvo una pendiente de 0.153 y un coeficiente de correlación de 0.986 (Fig. 6)

DETERMINACION DEL TIPO DE MOVILIDAD ESPERMATICA.

Para determinar el tipo de movilidad que presentó el espermatozoide en los diferentes medios de incubación, las células fueron obtenidas como ya se describió y añadidas "en seco" (sin ser resuspendidas previamente en la solución salina) a los siguientes medios: 1) solución salina; 2) Krebs Ringer Bicarbonato-Piruvato-Lactato (RKPL: NaCl 94.6 mM, KCl 4.78 mM, CaCl₂ 1.71 mM, KH₂PO₄ 1.19 mM, MgSO₄ 1.19 mM, NaHCO₃ 25.07 mM, lactato de sodio 21.58 mM y piruvato de sodio 0.5 mM; modificado de Toyoda y Chang, 1974) y 3) el medio anterior suplementado con glucosa 5.56 mM. La incubación fue llevada a cabo en un baño de agua a 37°C y teniendo aire como fase gaseosa. En cuanto la masa celular se disgregó, se empezaron a hacer observaciones a diferentes tiempos en un microscopio fotónico a un total de 100 aumentos. Las observaciones fueron hechas sin cubreobjetos y a intervalos de 5-10 min para cada muestra durante las dos primeras horas de la incubación; finalmente se hizo otra observación a las cinco horas de iniciado el experimento. Durante la prueba de la actividad de la proteína cinasa semipurificada (ver más adelante), se determinó el efecto de la 2-desoxiglucosa sobre la

CURVA PATRON DE ESPERMATOZOIDES

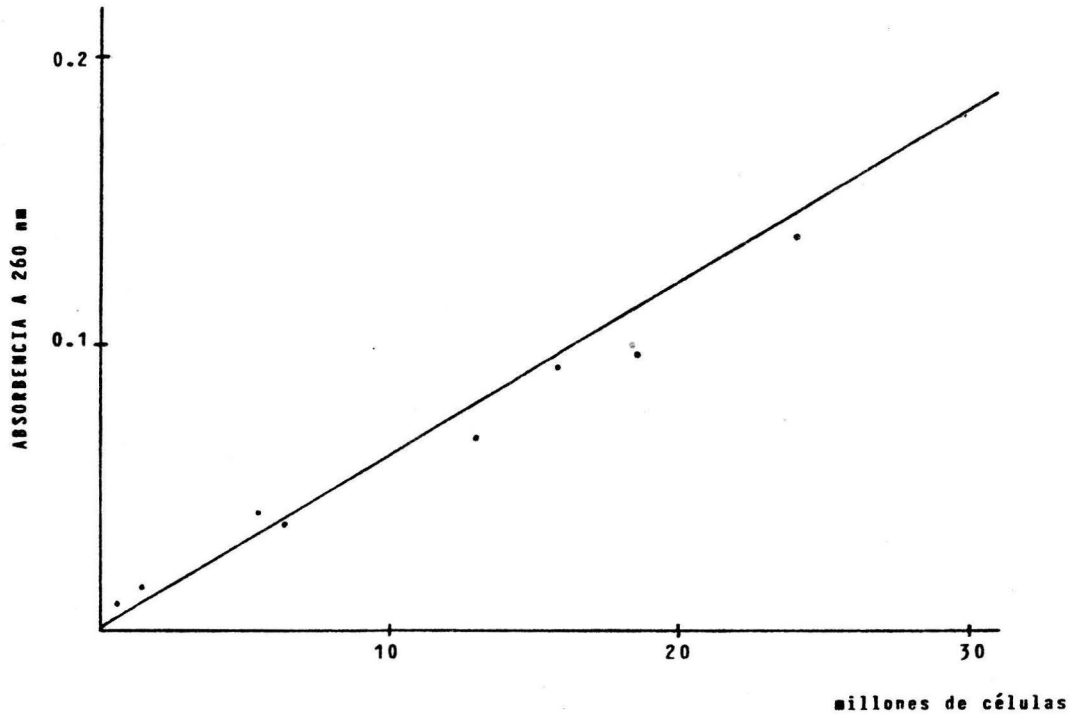


Fig. 6. Curva de calibración de espermatozoides solubilizados con SDS y DTT. La curva tuvo una pendiente de 0.153 y un valor de $r = 0.986$.

movilidad espermática durante los primeros minutos de la incubación.

Para la toma de fotografías y elaboración de los esquemas de movilidad, las muestras fueron observadas con cubreobjetos ya que de este modo se permite la apreciación de un solo plano.

TIEMPO DE INICIACION DE LA MOVILIDAD ESPERMATICA

Para determinar el tiempo en que inicia su movilidad el espermatozoide de la rata, se puso una pequeña gota de la muestra espermática "en seco" sobre un portaobjetos ya dispuesto en el microscopio fotónico y de inmediato se le añadió una gota del medio de prueba (cualquiera de los mencionados en la metodología anterior), el cual estaba a 37°C. La muestra se enfocó rápidamente y se registró el tiempo al cual comenzaron a moverse las células de la parte más externa de la gota.

NIVELES INTRAESPERMATICOS DE AMPc

I. Incubación de las células y extracción del nucleótido.

Para la determinación del AMPc intracelular se trabajó con la muestra de 3 animales. Los espermatozoides fueron extraídos y suspendidos en 1.6 ml de solución salina. En cuanto la suspensión

fue homogénea se tomaron 100 μ l y se fijaron por congelamiento dentro de un baño de hielo seco-acetona; cuando las células se congelaron, se añadieron 800 μ l de solución salina y 100 μ l de Tris 200 mM, EDTA 40 mM, pH 7.6. La concentración obtenida de esta muestra fue considerada como el nivel inicial del nucleótido. Entre los 10 y 15 min de permanencia de las células en la solución salina, se tomaron dos alícuotas de 0.6 ml y se vaciaron en forma simultánea en 4.8 ml de KRPL y KRPLG respectivamente. La glucosa fue probada (en experimentos diferentes) a dos concentraciones, 5.56 mM y 50 μ M. A los 15, 30, 45 y 60 seg y a los 5 min de iniciada la incubación en los medios, se tomaron 0.9 ml de cada muestra y se fijaron en hielo seco-acetona; después del congelamiento se agregaron 100 μ l del amortiguador Tris-EDTA ya citado. Posteriormente, las muestras fueron descongeladas y mantenidas en un baño de agua en ebullición durante 15 min; el ciclo de congelamiento-descongelamiento se repitió en cuatro ocasiones más. Concluidos los cinco ciclos, los espermatozoides se centrifugaron durante 10 min en una microcentrífuga, se tomaron 900 μ l del SN y se liofilizaron; la pastilla con el resto del SN se conservó para la cuantificación del número de células con la metodología ya expuesta (Moreno, 1985).

También fue valorado el efecto de la 2-desoxiglucosa sobre los niveles de AMPc intraespermático (ver sección de la semipurificación de la proteína cinasa dependiente de AMPc).

11. Cuantificación del AMPc

Para la medición del AMPc intraespermático, las muestras liofilizadas fueron reconstituídas con 150 μ l de amortiguador Tris 20 mM, EDTA 4mM, pH 7.6 y analizadas con el kit para cuantificación de AMPc de Amersham International. En forma breve, el ensayo consistió en tomar una alícuota de 50 μ l de cada muestra reconstituída (por duplicado) y mezclarla con 50 μ l de 3 H-AMPc estándar (0.025 μ Ci); después de agitar vigorosamente, se añadieron 100 μ l de una solución de proteína cinasa dependiente de AMPc y se incubó durante un periodo mínimo de dos horas en un baño de hielo y dentro de un cuarto frío. Al finalizar la incubación se agregaron a cada tubo 100 μ l de carbón activado al 5.5% en agua fría y se centrifugó durante 10 min en una microcentrífuga; se tomaron 200 μ l de SN y se vaciaron en un vial de vidrio que contenía 10 ml de coctel de centelleo (Insta-gel o Universol). Las muestras fueron contadas en un contador de centelleo líquido Tri Carb, por cuatro minutos, dos veces. Cada día de determinación se construyó una curva tipo utilizando AMPc estándar; la curva cubrió el intervalo de 0 a 16 pmoles del nucleótido (Fig. 7). Los valores encontrados para cada muestra se relacionaron con su número de células y se expresaron como pmoles de AMPc/10 millones de células.

Con el fin de disminuir los costos del análisis de AMPc se llevó a cabo la semipurificación de la proteína cinasa dependiente

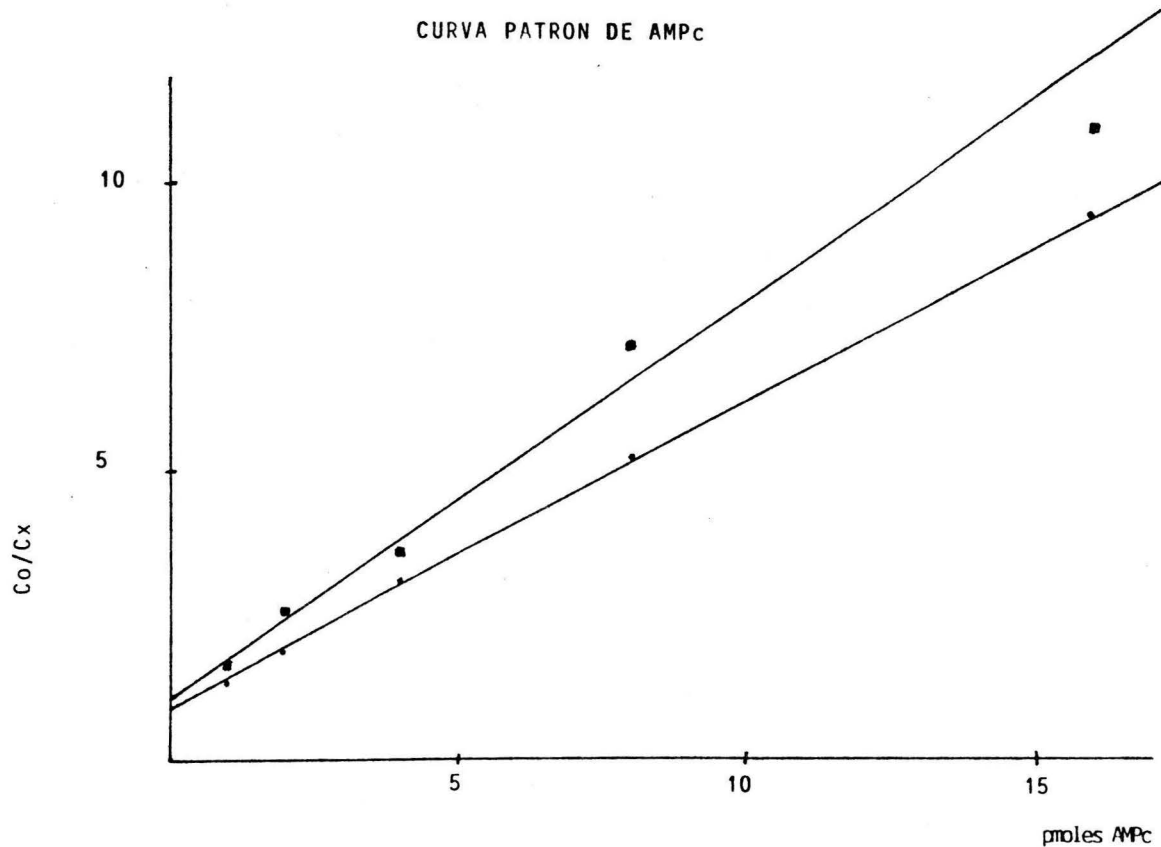


Fig. 7. Curvas de calibración de AMPc construidas con la proteína cinasa semipurificada (---) y con la del kit de cuantificación de AMPc de Amersham (-■-). La curva de la proteína comercial tuvo una pendiente de 0.695 y un valor de $r=0.997$; la de la proteína aislada, una pendiente de 0.530 y un valor de $r=0.999$. Los valores de Co/Cx representan la unión máxima sobre la unión de cada dilución.

de AMPc de músculo cardíaco de bovino y de esa manera hacer la cuantificación del nucleótido con la metodología descrita. Se utilizó el siguiente esquema de trabajo:

PURIFICACION PARCIAL DE LA PROTEINA CINASA DEPENDIENTE DE AMPc

Preparación del extracto protéico

El extracto se preparó con el músculo cardíaco de un bovino recién sacrificado. Todas las fases de la purificación se llevaron a cabo en frío. Cuatrocientos gramos del órgano (libres de tejido graso y capilares) fueron fragmentados en una picadora y posteriormente homogeneizados durante 20 seg en una licuadora con 500 ml de amortiguador Tris-HCl 50 mM, EDTA 4 mM, pH 7.5, frío. El extracto se centrifugó a 10 000 rpm/30 min/4°C en una centrífuga Sorvall con el rotor GSA. El SN fue fraccionado con sulfato de amonio; primero se saturó hasta el 25%, se mantuvo en agitación durante 30 min y se centrifugó a 10 000 rpm durante 15 min; el precipitado se eliminó y el SN fue saturado hasta el 45%, la solución se agitó 60 min más, se centrifugó como en las condiciones anteriores y se recuperó el precipitado. La pastilla obtenida se resuspendió en 54 ml de amortiguador de fosfato de potasio 5 mM, EDTA 0.5 mM, pH 7.5 y se dializó contra 4 litros del mismo amortiguador, con dos cambios. La diálisis duró 24 horas. El dializado fue centrifugado a 10 000 rpm durante 20 min, se eliminaron todos los precipitados y el SN quedó listo para la cromatografía en

DEAE-celulosa.

Cromatografía

La resina fue lavada con HCl 0.5 N y NaOH 0.5 N, enjuagada con agua bidestilada, y posteriormente empaquetada en columnas hechas con jeringas de plástico de 10 ó 20 ml. Las columnas fueron equilibradas con el amortiguador de fosfatos 5 mM, EDTA 0.5 mM pH 7.5 y se consideraron listas una vez que el pH de los eluatos fue igual al del amortiguador. La solución de proteínas que fue pasada por las columnas se preparó diluyendo 7.5 veces el extracto dializado con el amortiguador 5 mM. En cuanto la solución comenzó a pasar por las columnas, se inició la recolección de fracciones (de 3 ml para las columnas de 20 ml y de 1.5 ml para las columnas de 10 ml) con un colector automático y conforme eluían se iba leyendo su absorbencia a 280 nm. Cuando las proteínas terminaron de salir, se lavó la columna con el amortiguador de fosfatos hasta que la absorbencia de las fracciones fue menor de 0.1 unidad; posteriormente, las proteínas retenidas fueron eluidas de la columna con amortiguador de fosfato de potasio 100 mM, EDTA 0.5 mM. pH 7.5. Las fracciones con 0.6 o más unidades de absorbencia a 280 nm (Fig. 8) se unieron y se dializaron contra 1 litro del amortiguador 5 mM, con dos cambios, durante 12 horas. Después de la diálisis, la solución fue ajustada con amortiguador Tris-HCl y EDTA, pH 7.5, para

PERFIL DE ELUCION DEL EXTRACTO PROTEICO

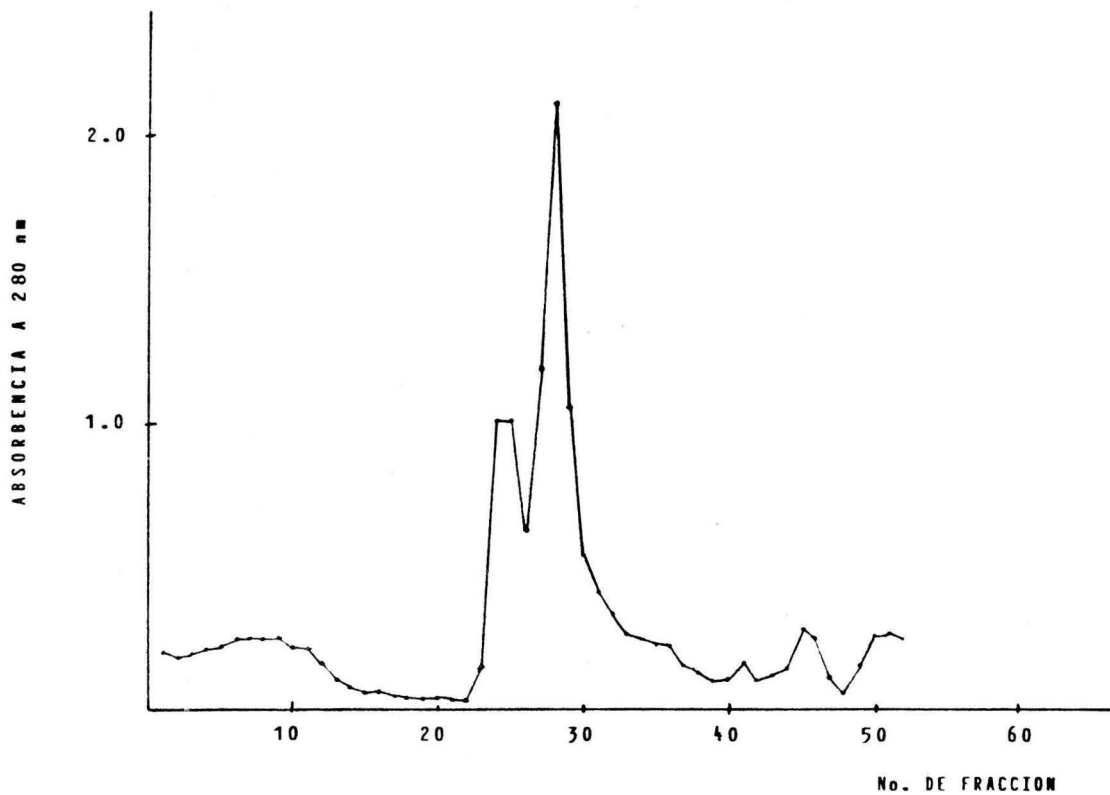


Fig. 8. Perfil de elución del extracto de músculo cardiaco de bovino en DEAE-celulosa. Se consideraron sólo las fracciones colectadas a partir de la adición del amortiguador de fosfato de potasio 100 mM.

quedar a una concentración final de 50 mM y 4 mM respectivamente. En este paso de la extracción se cuantificó la proteína total por el método de Lowry (Scopes, 1982), utilizando albúmina de suero de bovino (fracción V) como estándar. Finalmente, a una alícuota del extracto se le añadió la albúmina de suero de bovino necesaria para quedar al 1% y se le midió su actividad de unión al AMPc (según la metodología explicada para la cuantificación del nucleótido), haciendo varias diluciones con el amortiguador Tris-HCl ya citado. Una vez que se encontró la dilución en la cual la proteína unió el 55% de la marca (cpm) del ^3H -AMPc de la mezcla de reacción, toda la proteína (excepto una alícuota de 1 ml para el análisis electroforético, Fig. 9) se ajustó a esa concentración y se le añadió la albúmina necesaria para quedar al 1%. Aquí la proteína fue dividida y liofilizada para su almacenamiento.

La metodología descrita fue estructurada a partir de los trabajos de Tovey; *et al.*, 1974; Gilman, 1970 y Walsh, 1968.

VERIFICACION DE LA ACTIVIDAD

Con el fin de determinar la calidad de la proteína semipurificada y para complementar la información del efecto de la glucosa sobre los niveles de AMPc, se hicieron experimentos con la metodología ya descrita pero utilizando esta vez 2-desoxi-

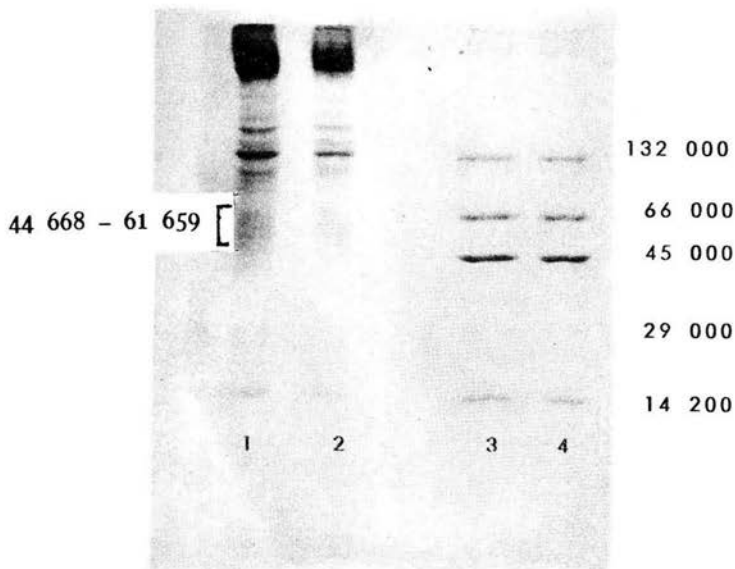


Fig. 9. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (Chua, 1980), del extracto de proteína semipurificada. En los carriles 1 y 2 se observa el patrón electroforético de la solución de proteína (en el carril 1 se corrieron 50 µg de proteína total y en el 2, 25 µg). Los carriles 3 y 4 son repeticiones de las proteínas estándar; éstas fueron: lactalbúmina (14200), anhidrasa carbónica (29000), ovoalbúmina (45000), monómero de albúmina sérica de bovino (66000) y dímero de albúmina sérica de bovino (132000). En los carriles 1 y 2 se señala la zona de bandeo en la que estarían contenidas las subunidades de la proteína cinasa dependiente de AMPc (Tipos I y II).

glucosa 5.56 mM. La cuantificación de los niveles de AMPc fue llevada a cabo utilizando la proteína obtenida en lugar de la que forma parte del kit de determinación. De igual manera, se construyó una curva de calibración con AMPc estándar y dentro del rango ya mencionado (Fig. 7).

NIVELES INTRAESPERMATICOS DE ATP

I. Incubación de las células y extracción del ATP

Se extrajo la muestra espermática de dos ratas y se suspendió en 1.5 ml de solución salina. A los 8 min aproximadamente, se tomaron 160 μ l de las células y se fijaron en 1.2 ml de agua bidestilada hirviente; esta muestra fue considerada como el punto inicial de las cinéticas de producción de ATP. A los 10-15 min de realizada la suspensión, se tomaron dos alícuotas de 0.64 ml de células y se añadieron en forma simultánea a dos tubos conteniendo 0.92 ml de medio Krebs-Ringer con y sin glucosa respectivamente, y se incubaron a 37 C (la glucosa se trabajó en las dos concentraciones citadas en la metodología anterior). A los 15, 30, 45 y 60 seg y a los 5 min de la adición de los medios, se fijaron 160 μ l de cada muestra como ya se indicó. Inmediatamente después de la fijación, los tubos permanecieron durante 10 min en un baño de agua en ebullición y después fueron puestos en hielo;

posteriormente se centrifugaron a 10 000 rpm por 30 min en una centrifuga refrigerada. El SN fue guardado a -20°C para cuantificar el ATP al día siguiente y la pastilla se procesó para determinar el número de espermatozoides.

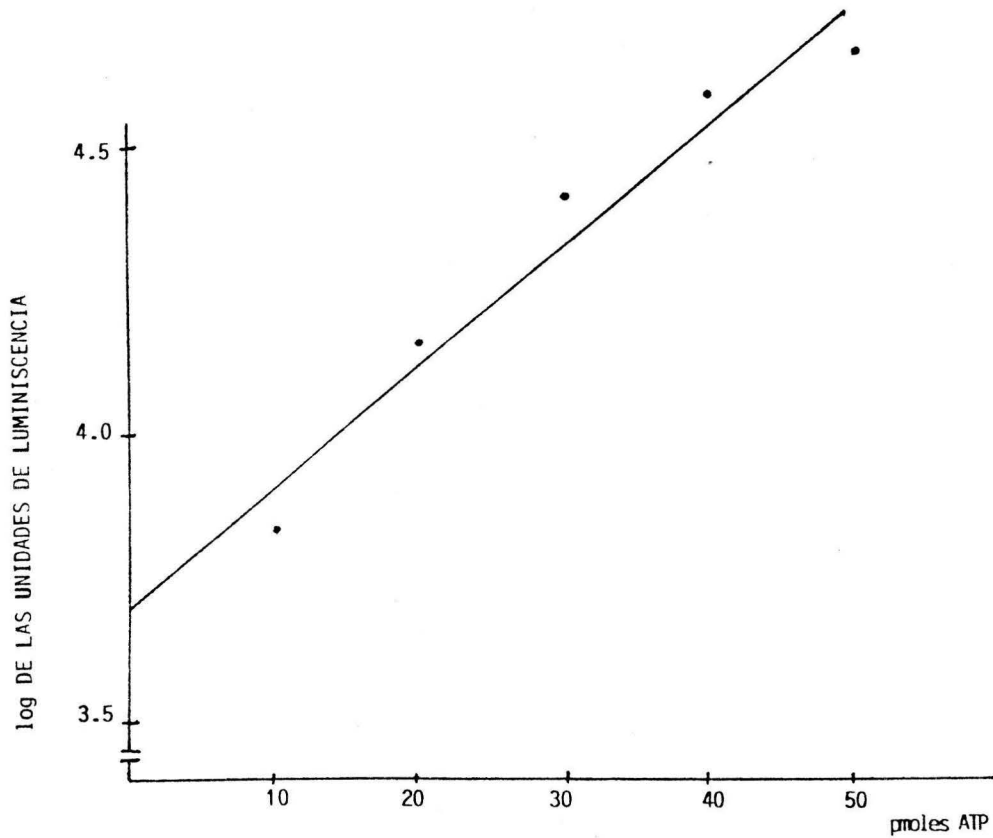
II. Cuantificación del ATP

La cuantificación de los niveles intraespermáticos de ATP se hizo por el método de la luciferina-luciferasa (Campos, 1990), utilizando un luminómetro Lab-Line. Para el análisis de cada muestra, se tomaron 100 μl del SN y se vaciaron dentro de un vial que contenía 0.86 ml de amortiguador MOPS (MOPS 50 mM, KH_2PO_4 1 mM, MgCl_2 10 mM, pH 7.8) y 30 μl de extracto de colas de luciérnaga en agua bidestilada estéril (20 mg/ml), decantado. Después de agitar vigorosamente, a los 5 seg de iniciada la reacción se leyó la luminiscencia emitida. Se hizo el número necesario de repeticiones hasta que hubiese dos muestras con una diferencia máxima de 100 unidades de luminiscencia. Para conocer los niveles intraespermáticos de ATP, cada día de determinación se hizo una curva patrón con ATP estándar, abarcando de 0 a 50 pmoles (Fig. 10). Los valores obtenidos se calcularon en nmoles de ATP/100 millones de espermatozoides.

MEDICION DEL CONSUMO DE OXIGENO ESPERMATICO

Se hicieron dos tipos de experimento, en el primero se extra-

CURVA PATRON DE ATP



47

Fig. 10. Curva de calibración de ATP obtenida por el método de la luciferina-luciferasa. La curva presentó un valor de pendiente de 0.021 y de correlación de 0.974.

jo la muestra de dos ratas y se suspendió en 1.5 ml de medio Krebs Ringer pH 7.4 sin sustratos; a los 10 min se tomaron 2 alícuotas de 1 ml y se pusieron a respirar simultáneamente en dos polarógrafos. Cuando se alcanzó la estabilidad, se añadieron al mismo tiempo 10 μ l de una solución concentrada de sustratos (piruvato-lactato a una muestra y piruvato-lactato-glucosa a la otra), quedando éstos en las concentraciones usuales. Cuando se observó un consumo constante, se añadió en ambas muestras un volumen de 10 μ l de glucosa concentrada. El procedimiento anterior fue repetido entre los 20-40 min tomando otra alícuota de la suspensión original. En el segundo tipo de experimento se suspendieron las células de dos ratas en 1 ml de solución salina, 10 min después se tomaron 50 μ l, se añadieron a 4.5 ml de medio Krebs Ringer con y sin glucosa 5.56 mM y se pusieron a respirar en forma simultánea; una vez alcanzada la estabilidad se añadieron 10 μ l de glucosa concentrada. También aquí hubo renovación de las muestras en ambos polarógrafos entre los 20-40 min de adición a los medios. Para los dos tipos de experimento se calculó el consumo como μ moles de oxígeno/100 millones de células/min.

ANALISIS ESTADISTICO.

Para los experimentos de cuantificación de AMPc y AIP, se empleó la prueba estadística t de Student para muestras no pareadas.

RESULTADOS

Movilidad Espermática

Las muestras espermáticas tuvieron siempre un porcentaje relativamente alto (hasta del 30%) de células inmóviles. Se observó que las muestras con calidad (elevado porcentaje de movilidad) eran proporcionadas por los animales con mayor peso.

En lo referente al inicio de la movilidad, este se presentó en todos los casos alrededor de los 10 seg de contacto con los medios (solución salina y Krebs Ringer con y sin glucosa). Durante la iniciación de la movilidad las células se disgregaron lentamente, formando inicialmente rosetas, que son agrupaciones en las que los gametos se encuentran unidos por la cabeza (fig 11). El tiempo de permanencia de las células en las rosetas fue también igual para todos los medios (7 minutos aproximadamente).

Por lo que respecta a los patrones de movilidad, el espermatozoide de la rata mostró básicamente tres tipos:

1. Movilidad ondulatoria. El flagelo se flexionaba suavemente hacia diferentes direcciones (fig. 12a).
2. Movilidad vibratoria. El flagelo permaneció extendido, flexionándose muy levemente y batiendo también hacia varias direcciones (fig. 12b).
3. Movilidad tetanizada. El flagelo se mostró flexionado pero rígido en una sola posición; la célula se movía dando varios



Fig. 11. Roseta de espermatozoides formada durante el inicio de movilidad en el medio RK (técnica de campo oscuro, 100X).

golpes hacia una dirección para después girar y seguir avanzando de igual manera sólo que en posición invertida. En este caso el impulso para la movilidad aparentemente era generado en la parte proximal del flagelo (12c).

Las células incubadas en solución salina presentaron un patrón de movilidad ondulatorio lento. La movilidad se mantuvo durante una hora de incubación aproximadamente; después de este tiempo el 100% de la población se inmovilizó. Los espermatozoides que estuvieron en contacto con la 2-desoxiglucosa mostraron al inicio una movilidad similar a la de las células incubadas en solución salina, pero fue haciéndose cada vez más lenta, de tal modo que a los 5 minutos toda la población se inmovilizó.

Entre las células incubadas en los medios con y sin glucosa se notó lo siguiente: durante el inicio de la incubación de ambas muestras (en la fase de rosetas), se presentó el movimiento vibratorio, la única posible diferencia en este momento es que en el medio con glucosa la movilidad parecía ser más rápida y con un ángulo de flagelación menor; sin embargo esta apreciación puede ser muy subjetiva. En cuanto las células de ambos medios se liberaron, se presentó tanto el patrón ondulatorio como el tetanizado. El movimiento ondulatorio se diferenció al presentado por las células incubadas en solución salina en que en los medios fue más rápido. En las muestras con glucosa predominó al principio el tipo tetanizado, pero durante la primera hora de incubación, la población espermática pasó hacia el ondulato-

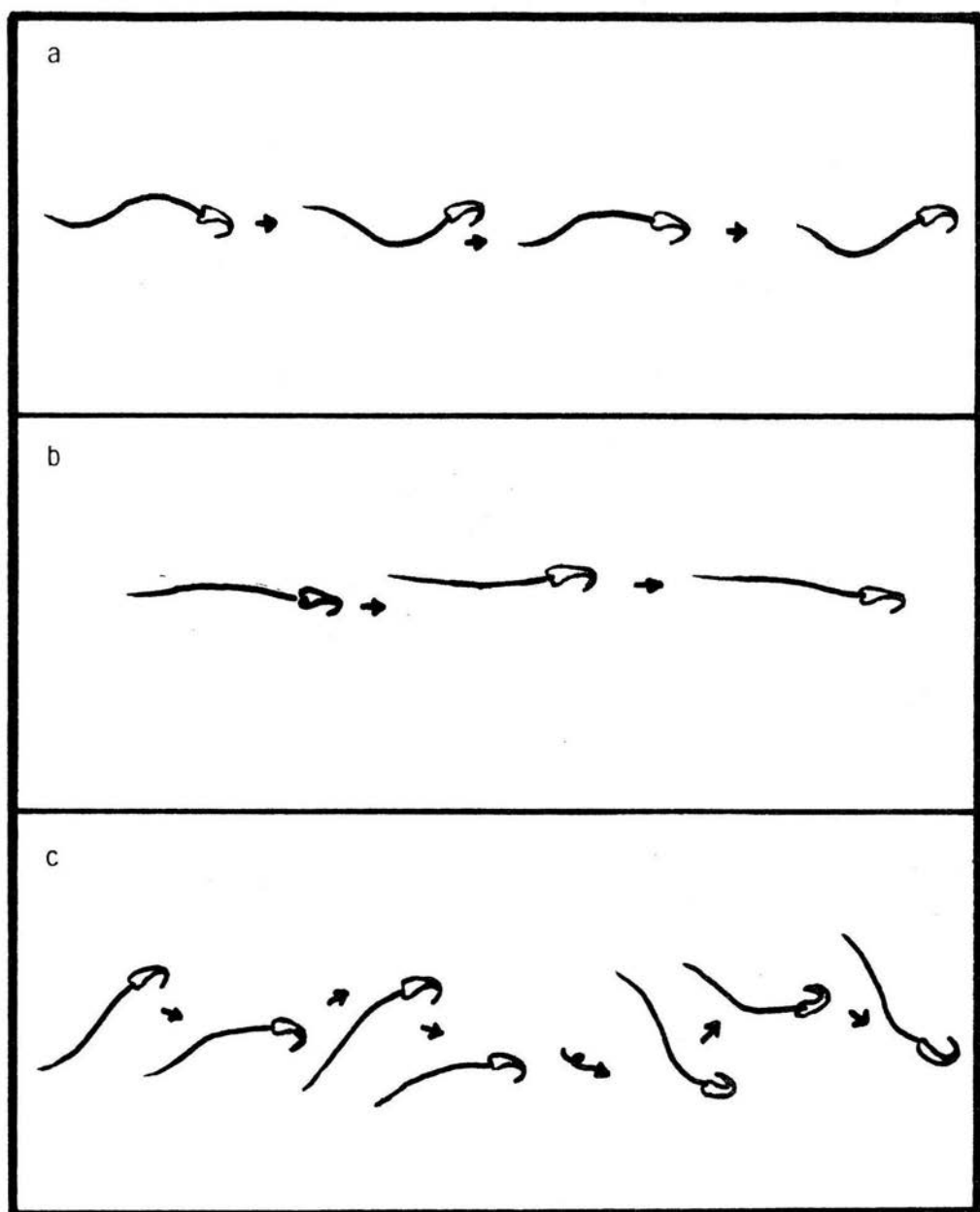


Fig. 12. Patrones de movilidad del espermatozoide de rata: a) ondulatorio, b) vibratorio y c) tetanizado.

rio. En este tiempo, la movilidad en el medio sin glucosa fue principalmente ondulatoria con ocasionales movimientos tetanizados. Hacia las 5 horas de incubación (tiempo de capacitación) ambas muestras presentaron una movilidad ondulatoria y un desplazamiento con mayor velocidad y en progresión lineal, a diferencia de la movilidad inicial, en la que las células se movían al azar.

En resumen, las figuras formadas por los espermatozoides incubados en los medios Krebs Ringer con y sin glucosa son muy semejantes en cada uno de los patrones mótils. Esto puede apreciarse en la figura 13, en la que se muestra cómo la postura del flagelo y el ángulo de ondulación son similares en ambas muestras, que se mueven en forma ondulatoria.

NIVELES DE AMPc INTRAESPERMATICO

Los resultados obtenidos en los espermatozoides incubados con glucosa se muestran en las figuras 14 y 15. Se encontró que al igual que en otras especies, el espermatozoide de la rata también presentó una elevación significativa ($P < 0.05$) con respecto al nivel basal (células en NaCl), durante los primeros segundos de incubación en los medios Krebs Ringer con y sin glucosa. Esta elevación se vio incrementada adicionalmente en forma significativa, por la presencia de la hexosa cuando se adicionó en la concentración 5.56 mM (Fig 14); la glucosa 50 μ M

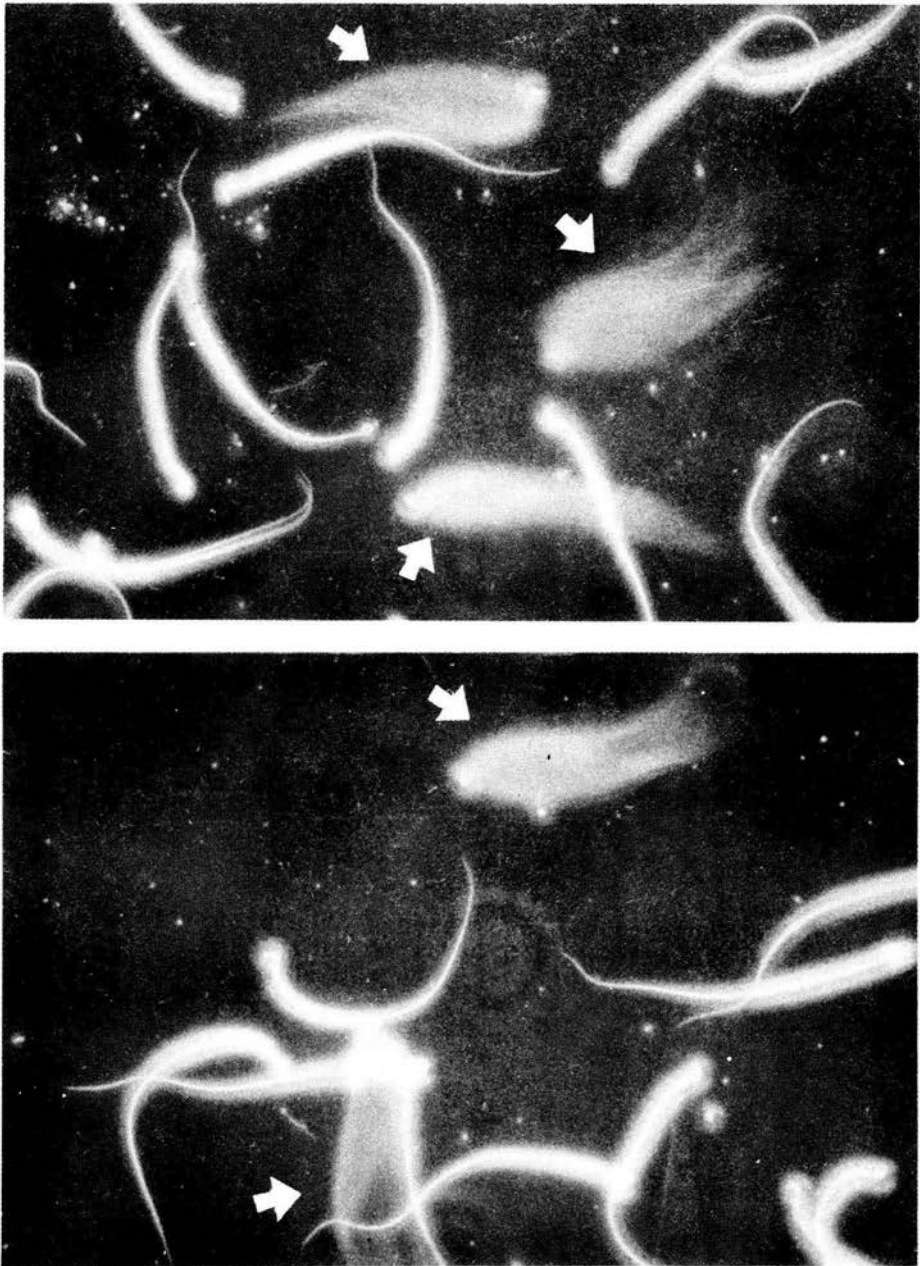


Fig. 13. Las flechas señalan células con movilidad ondulatoria incubadas en los medios RKG (fotografía superior) y RK (fotografía inferior). Nótese la similitud que hay tanto en la amplitud como en la forma de flagelación (técnica de campo oscuro 100X).

NIVELES DE AMPc INTRAESPERMATICO

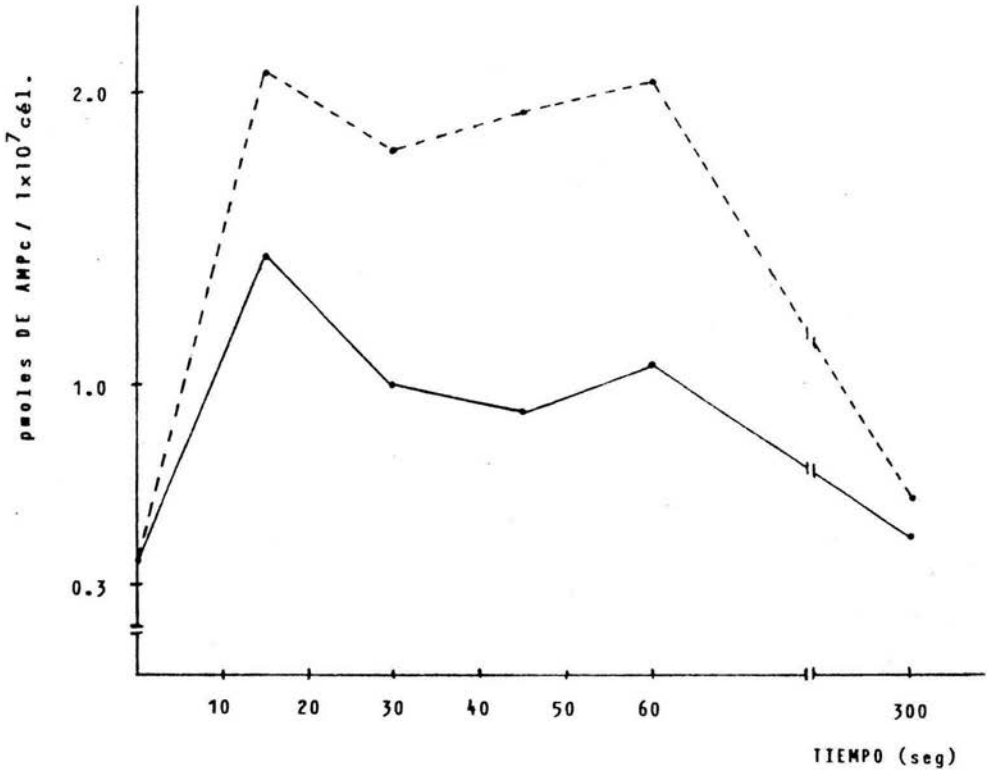


Fig.14. Cinética del contenido de AMPc intraespermático de células incubadas en los medios KR (—) y KRG 5.56 mM (---). Cada punto es el promedio de 5 experimentos. En todos los tiempos, exceptuando los 5 min, las diferencias fueron significativas estadísticamente, considerando un valor de significancia de 0.05.

NIVELES DE AMPc INTRAESPERMATICO

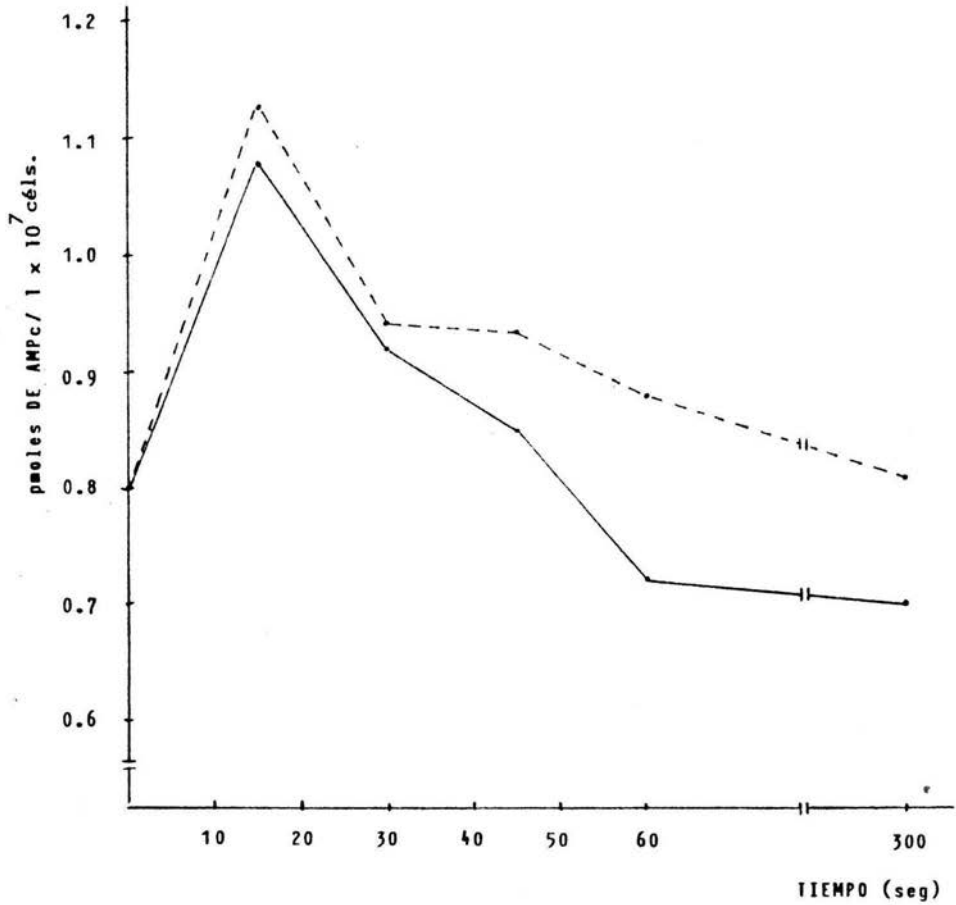


Fig.15. Contenido de AMPc intraespermático de células incubadas con los medios KR (—) y KRG 50 μ M (---). Cada punto es el promedio de 3 experimentos. Las curvas muestran diferencias estadísticamente significativas solamente a los 60 seg y a los 5 min.

NIVELES DE AMPc INTRAESPERMATICO

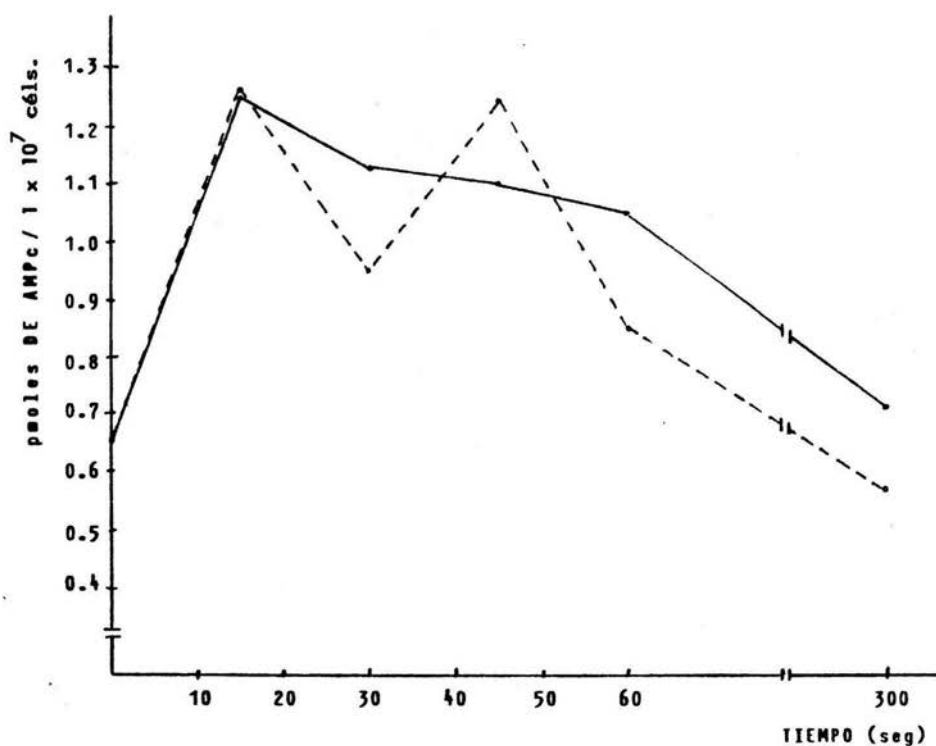


Fig. 16. Contenido de AMPc intraespermático de células incubadas con los medios Krebs Ringer (—) y éste adicionado con 2dglucosa 5.56 mM (---). Cada punto es el promedio de 3 experimentos. A un nivel de significancia de 0.05, no hubo diferencia en ninguno de los tiempos.

no fue capaz de promover un efecto similar (Fig 15). Entre los 30 y 60 seg de incubación se presentó un segundo pico, que en el caso de las muestras incubadas con glucosa concentrada fue casi tan alto como el pico inicial. En el medio sin glucosa esta segunda elevación fue menor pero aún significativamente mayor ($P < 0.05$) que el basal (fig 14). En la fig 5 se aprecia el segundo pico a los 45 seg de la incubación, pero es muy pequeño en comparación con el pico inicial, y sólo el de la muestra incubada con glucosa $50 \mu\text{M}$ es significativamente mayor con respecto al basal. La elevación en el contenido del AMPc fue seguida de una caída, que hacia los 5 minutos de la incubación llegó a valores cercanos al nivel basal del nucleótido.

Las células incubadas con 2-desoxiglucosa se comportaron de manera similar a las de glucosa $50 \mu\text{M}$: tuvieron, al igual que su control, una elevación inicial significativa en comparación con el basal, seguida de una caída. Al igual que la muestra de glucosa 5.56 mM , las células incubadas con la 2dglucosa presentaron un segundo pico de igual magnitud que el primero, sin embargo, no fue diferente de los niveles de AMPc del control sin la hexosa (figura 16).

NIVELES INTRAESPERMATICOS DE ATP

Durante el primer minuto de la incubación, los niveles de ATP cayeron en forma significativa ($P < 0.05$ contra el basal en NaCl).

NIVELES DE ATP INTRAESPERMATICO

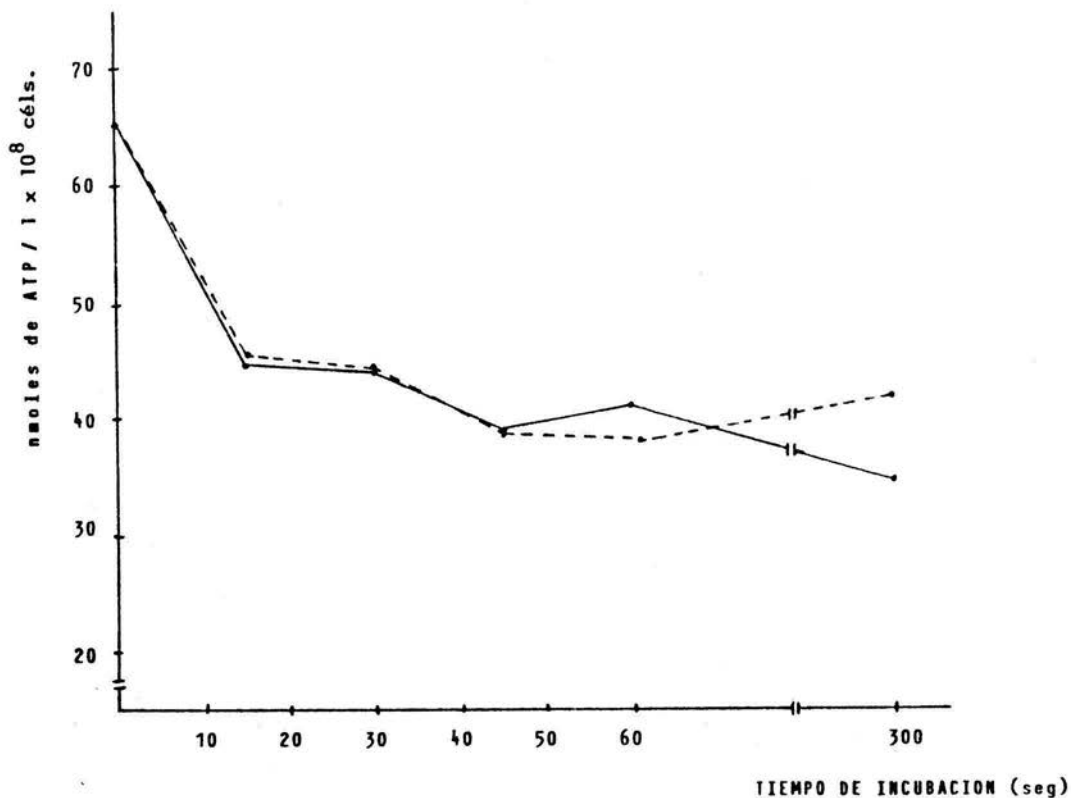


Fig.17. Contenido de ATP intraespermático de células incubadas en los medios KR (—) y KRG 5.56 mM (---). Cada punto representa el promedio de 5 experimentos. Sólo hubo diferencias estadísticamente significativas a los 5 min, tomando un valor de significancia de 0,05.

NIVELES DE ATP INTRAESPERMATICO

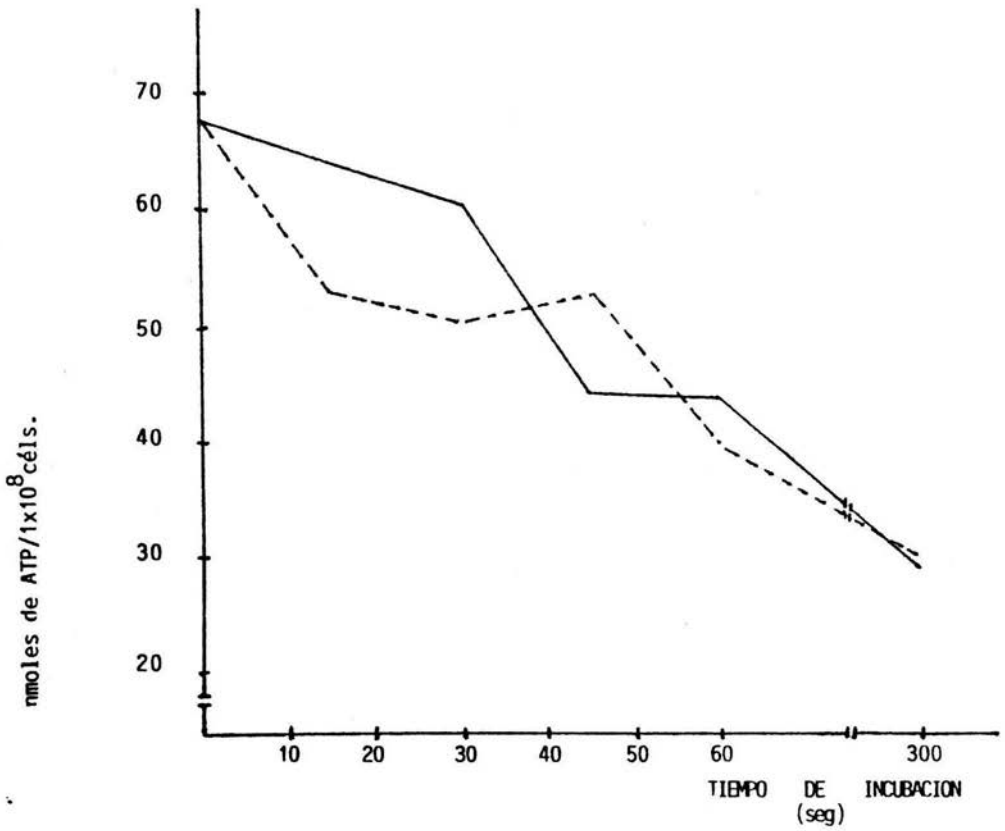


Fig. 18. Contenido de ATP intraespermático de células incubadas en los medios KR (-) y KRG (--). Cada punto es el promedio de 3 experimentos. La prueba estadística indica que no hay diferencia en ninguno de los tiempos ($P \leq 0.05$).

Entre los 15 y los 45 seg se observó una ligera recuperación, pero la caída continuó posteriormente. El descenso en el ATP siguió observándose entre el primero y el quinto minuto, pero de una manera más suave.

Este comportamiento en el contenido de ATP fue constante en todas las muestras estudiadas, y no hubo diferencia en la concentración de ATP mostrada por los espermatozoides incubados con glucosa y su control carente del carbohidrato. (figs 17 y 18).

CONSUMO DE OXIGENO

La medición del consumo de oxígeno fue hecha a dos tiempos, durante los primeros 40 min de incubación en los medios. Como puede apreciarse en el cuadro 1, la glucosa añadida simultáneamente con el lactato y el piruvato no tuvo un efecto consistente sobre la velocidad en el consumo de oxígeno, ya que promovió tanto estimulación como inhibición, o bien, como se indica en el cuadro 2, no causó ningún efecto. No se observó una relación inversa entre el número de células y el consumo de oxígeno. Tampoco se presentó el efecto Crabtree en ninguna de las condiciones experimentales: cuando la glucosa fue añadida desde el principio junto con el piruvato y el lactato, ni cuando se añadió en forma tardía a células preincubadas con piruvato y lactato (Cuadro 2).

CUADRO 1. Efecto de la adición temprana de glucosa simultánea con piruvato y lactato, sobre el consumo de oxígeno.

| Exp. No. | Tiempo de valoración (min). | consumo de O ₂ | | velocidad de consumo en $\frac{\text{KRPLG}}{\text{KRPL}} \times 100$ |
|----------|-----------------------------|---------------------------|----------------|---|
| | | nmoles/10 KRPL | céls/min KRPLG | |
| | 10 - 20 | | | |
| I | | 154.96 | 190.49 | 122.93 |
| II | | 55.17 | 84.10 | 152.44 |
| III | | 89.26 | 65.92 | 73.85 |
| | 20 - 40 | | | |
| I | | 143.94 | 99.44 | 69.08 |
| II | | 62.65 | 75.89 | 121.13 |
| III | | 52.30 | 135.48 | 259.04 |

Los espermatozoides ($2 - 8 \times 10^6$ céls/ml) se incubaron en los medios indicados. El consumo de oxígeno se valoró para cada muestra a los tiempos señalados a partir del inicio de la incubación, en forma simultánea. La glucosa se empleó a una concentración final de 5.56 mM.

CUADRO 2. Efecto de la adición tardía de glucosa sobre la velocidad respiratoria de los espermatozoi de la rata.

| Exp. No. | Consumo de O ₂ (nmoles/ 1 x 10 ⁸ céls/min) | | • % de es- timulación |
|-------------|--|--------------------|--------------------------|
| | sin glucosa | añadida la glucosa | |
| I | 154.96 | 212.98 | 37.91 |
| II | 55.17 | 68.89 | 24.87 |
| III | 97.76 | 97.76 | 0.0 |
| IV | 65.92 | 55.71 | -15.94 |

Las células ($2 - 6 \times 10^6$ /ml) se incubaron en el medio sin glucosa y se registró el consumo de oxígeno. Alrededor del minuto 15 de iniciada la incubación se añadió glucosa (concentración final de 5.56 mM) y volvió a registrarse el consumo.

DISCUSION

Con el fin de discutir los resultados obtenidos, es necesario considerar que la cuantificación de ATP, AMPc y consumo de oxígeno se hizo en muestras de células previamente suspendidas en solución salina, por tanto, no puede hablarse de que los eventos observados correspondan a la iniciación o readquisición de la movilidad, sino al inicio de la incubación en presencia de sustratos exógenos. Se trabajó con este tipo de muestras ya que se tenía que partir de una suspensión homogénea para que los sustratos llegaran al mismo tiempo a toda la población espermática pero en el caso de la rata, esto no fue posible debido a la alta densidad del plasma epididimal. Además de lo anterior, los espermatozoides fueron incapaces de soportar los lavados que usualmente se llevan a cabo en otras especies para depletar la movilidad y eliminar los componentes del plasma epididimal (esto para el caso de que se hubiera deseado trabajar con readquisición de la movilidad).

Por otra parte, es necesario dar explicación al hecho de que en ocasiones la desviación estándar sea demasiado grande en los experimentos de cuantificación de metabolitos (ver valores experimentales en el apéndice). En el laboratorio donde fue realizado el trabajo se ha observado de manera consistente que el espermatozoide del cuyo presenta una gran variabilidad

biológica, además de que es posible que los estados de madurez de las células obtenidas varíen aún dentro de la misma región. Por ejemplo, los gametos de rata se obtuvieron de la cauda del epidídimo, pero tomando en cuenta la longitud de esta zona, puede haberse obtenido una mezcla de células con diferentes estados maduracionales, lo que podría traducirse en ligeras variaciones del metabolismo. Finalmente, la técnica de cuantificación de células aquí utilizada es más precisa que la usada de manera convencional por la mayoría de los autores, ya que se puede conocer de manera directa el número de células por la cantidad de DNA presente en una muestra; sin embargo, en el caso de las muestras obtenidas de la rata, como ya se mencionó, fue consistente el elevado número de células inmóviles, que también fueron contabilizadas y por tanto consideradas cuando se hizo el cálculo final.

MOVILIDAD

La movilidad presentada por los espermatozoides incubados en solución salina indica que la célula utiliza sustratos endógenos así como las sustancias presentes en el plasma epididimal, probablemente glicerilfosforilcolina, ya que no se han encontrado carbohidratos (ni productos metabólicos de los mismos) o algún otro lípido oxidable (Jones, 1978). También los elevados niveles de ATP del espermatozoide pueden participar en el

sostenimiento de la movilidad en la solución salina. Hacia los 60 min de incubación, las células se inmovilizaron posiblemente por haberse agotado los sustratos y la reserva energética. Respecto al tipo de movilidad observada (ondulatoria muy lenta), la baja velocidad puede explicarse ya que se espera que el metabolismo sea menor que el presentado por las células incubadas con sustratos exógenos adicionales, así como por el pH inestable pero tendiente a la acidez, que caracteriza a la solución salina. Chulavatnatol en 1982 reportó que el espermatozoide de la rata era capaz de mostrar una buena movilidad al ser incubado en cloruro de sodio amortiguado con fosfato de potasio, con pH en un rango de 4 a 8; sin embargo, es necesario mencionar que en la literatura los autores pocas veces aclaran los criterios que toman para calificar de buena o mala a la movilidad. En el estudio referido el objetivo fue determinar el efecto de varios factores sobre la iniciación de la motilidad, por lo que puede suponerse que lo que se evaluó fue la presencia o ausencia de la misma; por otra parte, debe tomarse en cuenta la posibilidad de la estimulación de la adenilato ciclasa por el potasio del medio de incubación (Morisawa e Ishida, 1987).

La evaluación de la movilidad de las muestras incubadas con y sin glucosa indica que no hay diferencias aparentes entre ambas, pero sí hay un cambio en el patrón observado a lo largo de la incubación, independientemente de que el medio contenga o no

a la hexosa. Estas observaciones sin embargo, no permiten decir de una manera tajante que la glucosa no modifique de alguna manera (directa o indirecta) la movilidad durante el proceso de capacitación. Para hacer una aseveración semejante, deben tomarse en cuenta parámetros cuantitativos como son: velocidad de desplazamiento, direccionalidad, amplitud de flagelación, etc., pero que requieren de una infraestructura (aparatos) con los cuales no se contó para hacer este trabajo. Lo que sí podemos afirmar, es que de haber efecto de la glucosa, no es tan evidente como el que se ha observado en las células del cuyo.

El efecto de la 2-desoxiglucosa (2dglucosa) sobre la movilidad apoya lo citado en relación a un efecto indirecto del metabolismo de la glucosa sobre la movilidad. La 2dglucosa es fosforilada por la hexocinasa pero no es capaz de continuar su escisión (Mann y Lutwak-Mann, 1981) y por tanto inhabilita a la célula para obtener energía a partir de la glicólisis. Ford y Harrison, y Ford, *et al.* en 1981, reportaron el efecto de la 6-cloro-6-dglucosa sobre el metabolismo y la movilidad del espermatozoide de la rata, al administrar el carbohidrato *in vivo*. Los autores encontraron que los espermatozoides de los animales tratados con la hexosa, al ser extraídos e incubados en medio con glucosa mostraron un inicio de movilidad normal pero con una duración muy breve. Asimismo, la glicólisis se vio afectada en la actividad de varias enzimas y como consecuencia se presentó una acumulación de intermediarios. La presencia de piruvato y lactato

en el medio de incubación abatió el efecto anterior. La explicación encontrada es que la 6dglucosa causó una lesión metabólica que se evidenció en presencia de glucosa ya que las fallas fueron atribuidas al reciclaje fútil de sustratos que consiste en la fosforilación de la glucosa y de la fructosa-6-fosfato, seguida de su defosforilación sin el aprovechamiento de la energía liberada. El reciclaje de sustratos se traduce en un gasto excesivo de ATP lo que contribuye a un declinamiento en la carga energética de la célula. La oxidación de lactato y piruvato no se vio afectada por el tratamiento con la 6dglucosa. Bajo nuestras condiciones de estudio los resultados fueron diferentes, la movilidad se inició normalmente en las células incubadas en medio con piruvato, lactato y 2dglucosa pero se inmovilizaron en un breve tiempo. Atribuimos el hecho de que ni el láctico ni el pirúvico hayan podido contrarrestar el efecto de la 2dglucosa como observaron Ford y sus colaboradores con la 6dglucosa, a que ellos dieron tratamiento a los animales por vía oral, y aún cuando el tiempo de tratamiento fue relativamente largo, la dosis fue muy pequeña (120 $\mu\text{mol/kg/día}$ durante 14 días). A diferencia de ellos, nosotros trabajamos *in vitro* y con el carbohidrato en una concentración de 5.56 mM, por lo que suponemos que el efecto fue demasiado drástico. En esta parte del estudio se apoya lo propuesto por los autores en relación a que la glicólisis tiene para el espermatozoide de la rata un papel adicional a la simple producción de pirúvico, láctico y ATP, ya

que a pesar de ser una célula oxidativa, requiere de la glucosa para poder fecundar al óvulo. Nosotros encontramos que una falla en la glicólisis aún en presencia de los sustratos oxidables, conduce a la célula a la inmovilidad y por lo tanto, a la incapacidad de fertilización. Sin embargo, en un trabajo posterior (Ford y Harrison, 1987), ellos explicaron que el efecto nocivo podría deberse a una correlación entre el reciclaje fútil de sustratos y el efecto Crabtree (no determinado por ellos) pero de acuerdo a nuestros resultados, el espermatozoide de la rata no presenta este fenómeno. El efecto de la 2dglucosa sobre el AMPc será discutido más adelante.

NIVELES DE ATP

Atribuimos la caída en el ATP durante el inicio de la incubación a que el nucleótido es altamente requerido en esta fase por los eventos de inicio de movilidad, fosforilación de sustratos, síntesis de AMPc y el mismo reciclaje fútil que se considera espontáneo en el espermatozoide cuando se incuba en presencia de glucosa (Hammerstedt y Lardy, 1983). De esta manera, el espermatozoide de la rata produce ATP por la vía oxidativa (se verificó su consumo de oxígeno), pero al parecer la demanda es mayor que la producción por lo que la cinética muestra una baja en los niveles del nucleótido. Consideramos que este comportamiento del ATP se debe a que en la rata los valores

iniciales del nucleótido son muy altos comparándolos con los del cuyo (Frenkel, *et al.*, 1973; Campos, 1990) o en el hámster (White y Aitken, 1989), y en el caso del primero, bajo las condiciones de estudio lo que se observa es un incremento en el ATP cuando la célula se incubaba con glucosa (Campos, 1990). Creemos que en el espermatozoide de la rata los niveles basales tan elevados permiten tener el brusco descenso que observamos sin necesidad de incrementar la velocidad de producción del ATP para que ésta supere a su consumo. En cuanto a la falta de efecto de la glucosa sobre los niveles de ATP (aún en el comportamiento de descenso), suponemos se debe a que la célula mostró ser más oxidativa y en ambos medios de incubación estuvieron presentes el lactato y el piruvato, y si bien la presencia de la hexosa pudo haber causado un mayor gasto de ATP por el reciclaje de sustratos, este fenómeno no fue lo suficientemente intenso como para marcar, por sí solo, diferencias significativas.

CONSUMO DE OXIGENO

Los resultados obtenidos en los experimentos de consumo de oxígeno indican que el espermatozoide de la rata presenta un metabolismo oxidativo, ya que las muestras fueron capaces de utilizar los sustratos exógenos del medio. Se ha reportado que la tensión de oxígeno en el útero de la rata es de 25-40 mm Hg, valores superiores al mínimo necesario para que *in vivo*, el gameto

pueda obtener energía por la vía del Ciclo de Krebs (Mann y Lutwak Mann, 1981).

Consideramos que en la célula no se presenta el efecto Crabtree ya que la adición tardía de glucosa fue en la mayoría de los casos incapaz de causar inhibición alguna. Las variaciones en la respuesta a la glucosa pueden deberse al efecto de la agitación sobre la integridad de las células (en el caso de la inhibición) o a la disgregación de algún grumo no bien suspendido (en el caso de estimulación), pero como ya se dijo, no hubo un efecto consistente sobre el consumo. En las células tumorales el efecto Crabtree es producto de la falta de oxigenación al que se ven sometidas (Lyon, *et al.*, 1988), por lo que las condiciones favorables que se presentan al espermatozoide de la rata pueden explicar satisfactoriamente el porqué no presentan el citado fenómeno. Nuestros resultados en el consumo de oxígeno son congruentes con lo obtenido en el ATP ya que al no presentar la célula el efecto Crabtree tampoco hay diferencia en lo que se refiere a la oxidación de sustratos en presencia de glucosa.

Por otra parte, los resultados indican que no hay efecto de la densidad celular sobre el consumo de oxígeno a las concentraciones ensayadas; el efecto de dilución es evidente cuando se trabaja con concentraciones de un orden de diferencia (Cardullo y Cone, 1986) y nosotros en general trabajamos dentro de un corto rango. Finalmente, las muestras presentaron un consumo de oxígeno similar al ser incubadas con KRPL y KRPLG, esto es

explicable porque la glucosa es finalmente escindida hasta ácidos pirúvico y láctico, y tomando en cuenta que el espermatozoide tiene una vía oxidativa activa, ambos tratamientos pueden ser considerados como equivalentes.

NIVELES DE AMPc

El AMPc se presentó en cantidades significativamente mayores en las células incubadas con glucosa cuando se probó a una concentración de 5.56 mM. El efecto no parece ser atribuible a que la presencia del carbohidrato genera una mayor cantidad del precursor del nucleótido cíclico, ya que las cinéticas de ATP indican que no hay diferencia entre los tratamientos con y sin glucosa. Este razonamiento nos llevaría a pensar que el incremento en los niveles de AMPc por la glucosa se da al margen de los procesos energéticos, sin embargo, los resultados obtenidos en las células incubadas con la 2dglucosa, en las que no hay estimulación adicional cuando la hexosa se probó en la concentración de 5.56 mM indican que la glicólisis guarda relación con la elevación del AMPc espermático. Por otra parte, el hecho de que la glucosa 50 μ M no fuera capaz de causar la estimulación sugiere que el efecto (al nivel que suceda) tiene un carácter dosis-dependiente. El efecto positivo de la glucosa sobre el AMPc intraespermático no ha sido reportado por ningún otro grupo de investigación; sin embargo, existen antecedentes de

estimulación de la adenilato ciclasa por glucosa en *Saccharomyces cerevisiae* (Mazón, et al., 1982; Eraso y Gancedo, 1985). El mecanismo propuesto es a través de la activación de la adenilato ciclasa durante el transporte del azúcar; la glucosa permeasa actuaría como receptor del carbohidrato y el grado de estimulación de la ciclasa dependería directamente de la saturación del receptor. Esto permite explicar porqué el efecto se da sólo cuando la glucosa tiene una mayor concentración. Eraso y Gancedo probaron además otros azúcares para ver si el efecto dependía del metabolismo, y encontraron que los azúcares metabolizables promovieron una elevación seguida por un descenso que se mantuvo en un nivel estable, del doble del valor basal del nucleótido. Los azúcares fosforilables pero no metabolizables tuvieron efectos diferentes, entre ellos, la 2dglucosa ocasionó una muy leve elevación del nucleótido, sin el pico temprano. Al igual que el anterior, este resultado explica la falta de efecto de la 2dglucosa sobre el AMPc del espermatozoide de la rata. Si bien es cuestionable la validez en las comparaciones hechas anteriormente dadas las diferencias existentes entre la levadura y el espermatozoide, la carencia de otros hallazgos similares en el gameto de otra especie, así como el desconocimiento de los factores reguladores de la adenilato ciclasa espermática, nos permiten aventurarnos a pensar que en el espermatozoide puede presentarse un fenómeno análogo al que sucede en la levadura.

Otra explicación posible al fenómeno es la que nos brinda la

hipótesis propuesta por Pall en 1984, donde indica que los mecanismos de acción del AMPc han sido ampliamente conservados en la escala evolutiva, y que la estimulación del AMPc a la glicólisis observada en algunos organismos unicelulares puede ser extrapolada a las células de animales superiores. En este caso, la presencia de la glucosa podría inducir la mayor producción de AMPc para de esta manera acelerar la descomposición del sustrato hasta piruvato y lactato.

Finalmente, cabe la posibilidad de que la glucosa 5.56 mM pero no la 50 μ M promueva una elevada producción de ATP y que éste sea de inmediato transformado en AMPc; de esta manera las muestras incubadas con glucosa en elevadas concentraciones tendrían cantidades mayores de AMPc pero los niveles de ATP serían iguales a los de su control sin glucosa.

CONCLUSIONES

1. El espermatozoide de la rata no adquiere (por lo menos de manera evidente) un patrón de movilidad específico al ser incubado en presencia de glucosa.
2. El tiempo de iniciación de la movilidad no se ve afectado por el medio de suspensión de las células (solución salina o medio de cultivo con y sin glucosa).
3. Durante el inicio de la movilidad se presenta en el espermatozoide un descenso en los niveles de ATP, y al igual que en otras especies, un incremento en el AMPc intracelular.
4. La presencia de la glucosa no atenúa la caída del ATP intraespermático, tal vez porque los niveles elevados del nucleótido no lleguen a un nivel crítico para la célula y por tanto, no haya requerimientos energéticos emergentes.
5. La glucosa promueve una elevación adicional en los niveles del AMPc durante los primeros segundos de la incubación. No es claro si el efecto de la glucosa está relacionado con el metabolismo espermático. La estimulación de la adenilato ciclasa posiblemente esté relacionada con el transporte de la

hexosa al interior de la célula, o bien como una estrategia para acelerar la descomposición del carbohidrato.

6. El espermatozoide de la rata tiene metabolismo oxidativo que no se ve inhibido por la presencia de glucosa; es decir, no presenta el efecto Crabtree.

BIBLIOGRAFIA

- Baccetti, B. 1985. Evolution of the sperm cell. En Metz, Ch. B. y Monroy, A. (Eds). *Biology of Fertilization Vol 2 Biology of the sperm*. Academic Press, E.U.A. pp 3-57.
- Bavister, B.D. 1980. Recent Progress in the Study of Early Events in Mammalian Fertilization. *Develop. Growth and Differ.* 22: 385-402.
- Bedford, J.M. 1983. Significance of Need for Sperm Capacitation Before Fertilization in Eutherian Mammals. *Biol. Reprod.* 28: 108-120.
- Boell, E.J. 1985. Oxygen Consumption of Mouse Sperm and Its Relationship to Capacitation. *J. Exp. Zool.* 234: 105-116.
- Brooks, D.E.; Hamilton, D.W. y Mallek, A.H. 1974. Carnitine and Glycerolphosphorylcholine in the Reproductive Tract of the Male Rat. *J. Reprod. Fert.* 36: 141-160.
- Byskov, A.G. 1982. Primordial germ cells and regulation of meiosis. En Austin, C.R. y Short, R.V. (Eds) *Reproduction in Mammals Vol. 1 Germ cells and fertilization* 2o Edición. Cambridge University Press, Gran Bretaña, pp. 1-16.
- Campos, O.B. 1986. Metabolismo de carbohidratos y de lípidos del espermatozoide de los mamíferos. Ejercicio escrito del Exámen Predoctoral. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.
- Campos, O.B. 1990. Papel de la glucosa en la capacitación y en la reacción acrosomal de los espermatozoides del cuyo. Tesis doctoral. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.
- Cardullo, R.A. y Cone, R.A. 1986. Mechanical Immobilization of Rat Sperm Does Not Change Their Oxygen Consumption Rate. *Biol. Reprod.* 34: 820-830.
- Carr, D.W. y Acott, T.S. 1989. Intracellular pH Regulates Bovine Sperm Motility and Protein Phosphorylation. *Biol. Reprod.* 41: 907-920.
- Cascieri, M.; Amann, R.P. y Hammerstedt, R.H. 1976. Adenine Nucleotide Changes at Initiation of Bull Sperm Motility. *J. Biol. Chem.* 251: 787-793.
- Chua, N.; 1980. Electrophoretic analysis of chloroplast proteins. En Colowik, S.P. y Kaplan, N.O. (Eds.) *Methods in Enzymology, Vol 69: Photosynthesis and nitrogen fixation: Parte C*. Academic Press, E.U.A., 434-446.

- Chulavatnatol, M. 1982. Motility initiation of quiescent spermatozoa from rat caudal epididymis: effects of pH, viscosity, osmolality and inhibitors. *Int. J. Androl.* 5: 425-436.
- Cornwall, G.A.; Smyth, T.B.; Vindivich, D.; Harter, Ch.; Robinson, J. y Chang, T.S.K. 1986. Induction and Enhancement of Progressive Motility in Hamster Caput Epididymal Spermatozoa. *Biol. Reprod.* 35: 1065-1074.
- Davies, B.K.; Byrne, R. y 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. et Biophys. Acta* 558: 257-266.
- Davies, B.K.; Byrne, R. y Bedigian, K. 1980. Studies on the mechanism of capacitation: Albumin-mediated changes in plasma membrane lipids during *in vitro* incubation of rat sperm cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 1546-1550.
- Deana, R.; Rigoni, F.; Francesconi, M.; Cavallini, L.; Arslan, P. y Siliprandi, N. 1989. Effect of L-Carnitine and L-Aminocarnitine on Calcium Transport, Motility, and Enzyme Release from Ejaculated Bovine Spermatozoa. *Biol. Reprod.* 41: 949-955.
- Dukelow, W.R. 1971. Bioassay Techniques Related to Sperm Capacitation. *Acta Endocrinologica* 60: 503-514.
- Dunbar, B.S. y Wolgemuth, D.J. 1984. Structure and Function of the Mammalian Zona Pellucida, a Unique Extracellular Matrix. *Modern Cell Biology* 3: 77-111.
- Eddy, E.M. 1988. The Spermatozoon. En Knobil, E. y Neill, J. *et al* (Eds) *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, E.U.A., pp 27-68.
- Eraso, P. y Gancedo, J. 1985. Use of glucose analogues to study the mechanism of glucose-mediated cAMP increase in yeast. *FEBS* 191 (1) 51-54.
- Farooqui, A.A. 1983. Biochemistry of Sperm Capacitation. *Int. J. Biochem.* 15: 463-468.
- Ford, W.C.L. y Harrison, A. 1981. The effect of 6-chloro-6-deoxysugars on adenine nucleotide concentrations in and motility of rat spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 63: 75-79.
- Ford, W.C.L. y Harrison, A. 1987. Futile substrate cycles in the glycolytic pathway of boar and rat spermatozoa and the effect of α -chlorohydrin. *J. Reprod. Fert.* 79: 21-32

- Ford, W.C.L.; Harrison, A. y Waites, G.M.H. 1981. Effects of 6-chloro-6-deoxisugars on glucose oxidation in rat spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 63: 67-73.
- Fraser, L.R. 1977. Motility patterns in mouse spermatozoa before and after capacitation. *J. Exp. Zool.* 202: 439-444.
- Fraser, L.R. y Ahuja, K.K. 1988. Metabolic and Surface Events in Fertilization. *Gamete Research* 20: 491-519.
- Fraser, L.R. y Herod, J.E. 1990. Expression of capacitation-dependent changes in chlortetracycline fluorescence patterns in mouse spermatozoa requires a suitable glycolysable substrate. *J. Reprod. Fert.* 88: 611-621.
- Frenkel, G.; Peterson, N. y Freund, M. 1973a. Changes in the Metabolism of Guinea Pig Sperm from Different Segments of the Epididymis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 143: 1231-1236.
- Frenkel, G.; Peterson, N. y Freund, M. 1973b. The Role of Adenine Nucleotides and the Effect of Caffeine and Dibutyryl Cyclic AMP on the Metabolism of Guinea Pig Epididymal Spermatozoa. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 144: 420-425.
- Garbers, D.L.; Lust, W.D.; First, N.L. y Lardy, H.A. 1971. Effects of Phosphodiesterase Inhibitors and Cyclic Nucleotides on Sperm Respiration and Motility. *Biochem.* 10: 1825-1831.
- Garbers, D.L. y Kopf, G.S. 1980. The Regulation of Spermatozoa by Calcium and Cyclic Nucleotides. *Adv. Cyclic Nucl. Res.* 13: 251-306.
- Gilman, A.G. 1970. A Protein Binding Assay for Adenosine 3':5'-Cyclic Monophosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 67: 305-312.
- Hammerstedt, R. y Lardy, H. 1983. The Effect of Substrate Cycling on the ATP Yield of Sperm Glycolysis. *J. Biol. Chem.* 258 (14) 8759-8768.
- Hildebrandt, J.D.; Codina, J.; Tash, J.S.; Kirchick, H.J.; Lipschultz, R.D.; Sekura, R.D. y Birnbaumer, L. 1985. The Membrane-Bound Spermatozoal Adenylyl Cyclase System Does not Share Coupling Characteristics with Somatic Cell Adenylyl Cyclases. *Endocrinology* 116: 1357-1366.
- Hinrichsen-Kohane, A.C.; Hinrichsen, M.J. y Schill, W.B. 1984. Molecular Events Leading to Fertilization - A review. *Androl.* 16: 321-341.
- Hoppe, J. y Wagner, K.G. 1979. cAMP-dependent protein kinase I, a unique allosteric enzyme. *TIBS* 4: 282-285.

- Horowitz, J.A.; Toeg, H. y Orr, G.A. 1984. Characterization and Localization of cAMP-dependent Protein Kinases in Rat Caudal Epididymal Sperm. *J. Biol. Chem.* 259: 832-838.
- Horowitz, J.A.; Wasco, W.; Leiser, M. y Orr, G.A. 1988. Interaction of the Regulatory Subunit of a Type II cAMP-dependent protein Kinase with Mammalian Sperm Flagellum. *J. Biol. Chem.* 263: 2098-2104.
- Hoskins, D.D. y Casillas, E.R. 1975. Function of cyclic nucleotides in mammalian spermatozoa. En Greep, R.O. y Astwood, E.B. *Handbook of Physiology Vol. V. Endocrinology Male Reproductive System.* American Physiological Society. E.U.A. pp. 453-460.
- Hunter, R.H.F. 1987. The timing of capacitation in mammalian spermatozoa - a reinterpretation. *Research in Reproduction* 19: 3-4.
- Ishida, K; Okuno, M.; Morisawa, S.; Mohri, T.; Mohri, H.; Waku, M. y Morisawa, M. 1987 Initiation of Sperm Motility Induced by Cyclic AMP in Hamster and Boar. *Develop. Growth and Differ.* 29: 47-56.
- Jones, R. 1978. Comparative Biochemistry of Mammalian Epididymal plasma. *Comp. Biochem. Physiol.* 61: 365-370.
- Leese, H.J.; Astley, N.R. y Lambert, D. 1981. Glucose and fructose utilization by rat spermatozoa within the uterine lumen. *J. Reprod. Fert.* 61: 435-437.
- Lindemann, Ch. B.; Goltz, J.S. y Kanous, K. 1987. Regulation of Activation State and Flagellar Wave Form in Epididymal Rat Sperm: Evidence for the Involvement of Both Ca^{2+} and cAMP. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 8: 324-332.
- Lyon, R.; Cohen, J.; Faustino, P.; Megnin, F. y Miers, Ch. 1988. Glucose Metabolism in Drug-sensitive and Drug-resistant Human Breast Cancer Cells Monitored by Magnetic Resonance Spectroscopy. *Cancer Research* 48: 870-877.
- Mann, T. y Lutwak-Mann, C. 1981. Male Reproductive Function and Semen. *Themes and Trends in Physiology, Biochemistry and Investigative Andrology.* Springer-Verlag. E.U.A. 495 pp.
- Margulis, L. 1986. El origen de la célula. Ed. Reverté, España, 142 pp.
- Mazón, M.J., Gancedo, J.M. y Gancedo, C. 1982. *Eur. J. Biochem.* 127: 605-608.

- Morales, P.; Overstreet, J.W. y Katz, D.F. 1988. Changes in human sperm motion during capacitation *in vitro*. J.Reprod. Fert. 83: 119-128.
- Moreno, R.A. 1985. Modula la glucosa el contenido de AMP cíclico en los espermatozoides del cuyo?. Tesis de Maestría en Ciencias. Biología Celular CINVESTAV.
- Morisawa, M. e Ishida, K. 1987. Short-Term Changes in Levels of Cyclic AMP, Adenylate Cyclase, and Phosphodiesterase During the Initiation of Sperm Motility in Rainbow Trout. J. Exp. Zool. 242: 199-204.
- Mújica, A. y Valdés, M. 1983. On the Role of Glucose in Capacitation and Acrosomal Reaction of Guinea Pig Sperm. Gamete Research 8: 335-344.
- Mújica, A.; Moreno, R.; Naciff, J.; Neri, L. y Tash, J. 1991. Glucose regulation of guinea-pig sperm motility. J. Reprod. Fert. 92: 75-87.
- Nagano, T. 1965. Localization of Adenosine Triphosphatase activity in the rat sperm tail as revealed by electron microscopy. J. Cell Biol. 25: 101-112.
- Nelson, L. 1985. Sperm Cell Enzymes. En Metz, Ch.B. y Monroy, A. (Eds) Biology of Fertilization Vol 2 Biology of the Sperm. Academic Press. E.U.A. pp 215-233.
- Nelson, L.; Gardner, M.E. y Young, M.J. 1982. Regulation of Calcium Distribution in Bovine Sperm Cells: Cytochemical Evidence for Motility Control Mechanisms. Cell Motility 2: 225-242.
- Niwa, K. e Iritani, A. 1978. Effect of various hexoses on sperm capacitation and penetration of rat eggs *in vitro*. J. Reprod. Fert. 53: 267-271.
- Noland, T.D.; Corbin, J.D. y Garbers, D.L. 1986. Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase Isozymes of Bovine Epididymal Spermatozoa: Evidence against the Existence of an Ectokinase. Biol. Reprod. 34: 681-689.
- Ohno, S. 1980. The Development of Sexual Reproduction. En Austin, C.R. y Short, R.V. (Eds) Reproduction in Mammals Vol. 6 The Evolution of Reproduction. Cambridge University Press, Gran Bretaña.
- Okamura, N.; Tajima, Y.; Soejima, A.; Masuda, H. y 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.

- Pall, M. 1984. Is there a general paradigm of cyclic AMP action in eukariotes? *Molec. & Cell. Biochem.* 58: 187-191.
- Paz-Frenkel, G.; Kaplan, R.; Yedwab, G.; Homonnai, Z.T. y Kraicer, P.F. 1978. The Effect of Caffeine on Rat Epididymal Spermatozoa: Motility, Metabolism and Fertilizing Capacity. *Int. J. Androl.* 1: 145-152.
- Pusch, H.H. 1987. The Importance of Sperm Motility for the Fertilization of Human Oocytes in vivo and in vitro. *Andrologia* 19: 514-527.
- Reyes, A.; Mercado, E.; Goicoechea, B. y Rosado, A. 1976. Participation of membrane sulfhydryl groups in the epididymal maturation of human and rabbit spermatozoa. *Fertil. Steril.* 27: 1452-1458.
- Rogers, B.J. y Yanagimachi, R. 1975. Retardation of guinea pig sperm acrosome reaction by glucose: the possible importance of pyruvate and lactate metabolism in capacitation and acrosome reaction. *Biol. Reprod.* 13: 568-575.
- Rogers, B.J.; Chang, L y Yanagimachi, R. 1979. Glucose Effect on Respiration: Possible Mechanism for Capacitation in Guinea Pig Spermatozoa. *J. Exp. Zool.* 207: 107-112.
- Scopes, R.K. 1984. Protein Purification. Principles and Practice. Springer Verlag, E.U.A. 282 pp.
- Setchell, B.P. 1982. Spermatogenesis and spermatozoa. En Austin, C.R. y Short, R.V. (Eds) *Reproduction in Mammals Vol. 1 Germ cells and fertilization* 2o Edición. Cambridge University Press, Gran Bretaña, pp 63-101.
- Shalgi, R.; Matityahu, A. y Nebel, L. 1986. The Role of Carbohydrates in Sperm-Egg Interaction in Rats. *Biol. Reprod.* 34: 446-452.
- Stein, D.M. y Fraser, L.R. 1984. Cyclic Nucleotide Metabolism in Mouse Epididymal Spermatozoa During Capacitation In Vitro. *Gamete Research* 10: 283-299.
- Stock, C.E. y Fraser, L.R. 1989. Divalent cations, capacitation and the acrosome reaction in human spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 87: 463-478.
- Tajima, Y.; Okamura, N. y Sugita, Y. 1987. The activating effects of bicarbonate on sperm motility and respiration at ejaculation. *Biochem et Biophys. Acta* 924: 519-529.

- Tash, J.S. y Means, A.R. 1982. Regulation of Protein Phosphorylation and Motility of Sperm by Cyclic Adenosine Monophosphate and Calcium. *Biol. Reprod.* 26: 745-763.
- Tash, J.S. y Means, A.R. 1983. Cyclic Adenosine 3',5' Monophosphate, Calcium and Protein Phosphorylation in Flagellar Motility. *Biol. Reprod.* 28: 75-104.
- Tash, J.S. y Means, A.R. 1987. Ca²⁺ Regulation of Sperm Axonemal Motility. *Methods in Enzymology* 139: 808-823.
- Tovey, K.C.; Oldham, K.G. y Whelan, J.A.M. 1974. A simple direct assay for cyclic AMP in plasma and other biological samples using an improved competitive protein binding technique. *Clin. Chim. Acta* 56: 221-234.
- Toyoda, Y. y Chang, M.C. 1974. Fertilization of Rat Eggs *in vitro* by epididymal spermatozoa and the development of eggs following transfer. *J. Reprod. Fert.* 36: 9-22.
- Tso, W-W; Leung, W-N y Tso, M-Y. 1987. The Structural Specificity of Carbohydrate in the Initiation of Rat Sperm Motility. *Int. J. Fertil.* 32: 77-80.
- Tsunoda, Y. y Chang, M.C. 1975. *In vitro* Fertilization of Rat and Mouse Eggs by Ejaculated Sperm and the Effect of Energy Sources on *in vitro* Fertilization of Rat Eggs. *J. Exp. Zool.* 193:79-86
- Turner, T.T. y Howards, S.S. 1978. Factors Involved in the Initiation of Sperm Motility. *Biol. Reprod.* 18: 571-578.
- Usselman, M.C. y Cone, R.A. 1983. Rat Sperm are Mechanically Immobilized in the Caudal Epididymis by "Immobilin", a High Molecular Weight Glycoprotein. *Biol. Reprod.* 29: 1241-1253.
- Walsh, D.A.; Perkins, J.P. y Krebs, E.G. 1968. An Adenosine 3', 5'-Monophosphate-dependant Protein Kinase from Rabbit Skeletal Muscle. *J. Biol. Chem.* 243: 3763-3765.
- White, D. y Aitken, R.J. 1989. Relationship Between Calcium, Cyclic AMP, ATP, and Intracellular pH and the Capacity of Hamster Spermatozoa to Express Hyperactivated Motility.
- Yanagimachi, R. 1980. *In Vitro* Sperm Capacitation and Fertilization of Golden Hamster Eggs in a Chemically Defined Medium. *Arch. of. Androl.* 5: 62-63.
- Yanagimachi, R. 1988. Mammalian Fertilization. En Knobil, E. y Neill, B.J. (Eds.) *The Physiology of Reproduction Vol. 1 Cap. 5* Raven Press, E.U.A., 135-185.

| Muestra | Tiempo | CONTENIDO DE ATP (rmoles/ 1×10^6 células.) | |
|---------|--------|---|--------------------|
| | | glucosa 5.56mM | glucosa 50 μ M |
| Basal | 0 | 65.29 \pm 9.12 | 67.84 \pm 24.74 |
| RK | 15 seg | 44.98 \pm 14.31 | 64.14 \pm 1.03 |
| RKG | 15 seg | 45.64 \pm 16.35 | 53.30 \pm 13.68 |
| RK | 30 seg | 44.19 \pm 13.69 | 60.76 \pm 23.97 |
| RKG | 30 seg | 44.30 \pm 10.21 | 50.72 \pm 29.77 |
| RK | 45 seg | 39.79 \pm 15.90 | 44.30 \pm 28.16 |
| RKG | 45 seg | 39.44 \pm 13.76 | 52.96 \pm 11.09 |
| RK | 60 seg | 41.15 \pm 17.69 | 44.08 \pm 13.27 |
| RKG | 60 seg | 38.47 \pm 16.05 | 39.89 \pm 24.92 |
| RK | 5 min | 34.55 \pm 32.65 | 29.13 \pm 3.25 |
| RKG | 5 min | 42.02 \pm 14.26 | 29.81 \pm 1.08 |

Cuadro 3. Valores obtenidos durante las determinaciones de ATP. Los valores de los experimentos con glucosa 50 μ M son la media de 3 experimentos y los obtenidos con glucosa 5.56 mM, de 5 determinaciones. Cada valor se representa \pm su desviación estándar.

| Muestra | Tiempo | glucosa 5.56 mM | glucosa 50 uM | 2dglucosa |
|---------|--------|-----------------|---------------|-------------|
| Basal | 0 | 0.38 ± 0.37 | 0.80 ± 0.34 | 0.66 ± 0.08 |
| RK | 15 seg | 1.44 ± 0.51 | 1.08 ± 0.73 | 1.25 ± 0.17 |
| RKG | 15 seg | 2.07 ± 0.67 | 1.13 ± 0.67 | 1.26 ± 0.30 |
| RK | 30 seg | 0.99 ± 0.43 | 0.92 ± 0.32 | 1.13 ± 0.14 |
| RKG | 30 seg | 1.80 ± 0.62 | 0.94 ± 0.18 | 0.95 ± 0.10 |
| RK | 45 seg | 0.90 ± 0.20 | 0.85 ± 0.21 | 1.10 ± 0.35 |
| RKG | 45 seg | 1.93 ± 0.74 | 0.93 ± 0.35 | 1.24 ± 0.15 |
| RK | 60 seg | 1.07 ± 0.45 | 0.72 ± 0.22 | 1.05 ± 0.18 |
| RKG | 60 seg | 2.04 ± 0.58 | 0.88 ± 0.30 | 0.85 ± 0.20 |
| RK | 5 min | 0.47 ± 0.41 | 0.70 ± 0.48 | 0.71 ± 0.09 |
| RKG | 5 min | 0.60 ± 0.42 | 0.81 ± 0.29 | 0.57 ± 0.06 |

Cuadro 4. Valores obtenidos de los experimentos de AMPc intraespermático. Cada valor es la media ± su desviación estándar y está dado en pmoles de AMPc/1 x 10 células. Los experimentos realizados con glucosa 5.56 mM tuvieron 5 repeticiones y los de glucosa 50 uM y 2dglucosa (5.56 mM), 3.