



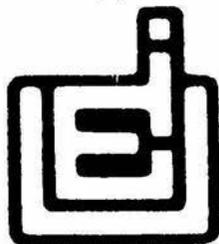
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"IZTACALA"

**FERTILIZACION HETEROLOGA CON ESPERMATOZOIDES
DE CUYO CON REACCION ACROSOMAL
SINCRONICA TEMPRANA.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
MARGARITA ZARATE GRANDE

Director de Tesis: Dra. Adela Mújica de Hernández



Los Reyes Iztacala, Edo. de México

1994



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 y hermanos.

A Ricardo con mucho amor, agradeciendo su estímulo, amor, orientación y ayuda en todos y cada uno de los momentos juntos.

A Angel por su empeño y aliento.

A la Dra. Adela Mújica por toda su paciencia, comprensión, conocimientos y apoyo en la realización de este trabajo, así como por su valiosa amistad.

AGRADECIMIENTOS

Al destino, que me puso al encuentro con la Biología.

A Lety por su ayuda y amistad.

A todos y cada uno de mis compañeros de laboratorio.

Al departamento de Microscopía Electrónica del Dpto. de Biología Celular del CINVESTAV, por su ayuda en la utilización del microscopio de epifluorescencia.

A Don José (q.e.p.d.) por su ayuda y en su memoria.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politecnico Nacional, en el laboratorio y bajo la dirección de la Dra. Adela Mújica de Hernández.

I N D I C E

	Página.
Introducción.....	1
Fertilización.....	1
El espermatozoide de los mamíferos.....	2
Principales cambios fisiológicos durante la maduración epididimal.....	4
Capacitación del espermatozoide.....	5
Reacción acrosomal.....	7
El óvulo.....	10
Características estructurales del óvulo.....	10
Maduración de los ovocitos.....	12
Interacción espermatozoide-óvulo.....	13
Bloqueo a la polispermia.....	13
ANTECEDENTES.....	15
OBJETIVOS.....	17
METODOLOGIA.....	18
Superovulación y obtención de los óvulos de hámster.....	18
Obtención de lo óvulos desnudos.....	19
Obtención y lavado de los espermatozoides.....	20
Inducción de la reacción acrosomal por procaína e inseminación de los óvulos.....	21
Valoración de la reacción acrosomal en los esper- matozoides del cobayo.....	22

Valoración de la fertilización.....	23
Tinción de lo óvulos con el reactivo de Hoechst 33258.....	24
RESULTADOS.....	25
Inducción de la reacción acrosomal por procaína..	25
Determinación de la capacidad fertilizante de los espermatozoides con reacción acrosomal producida por procaína.....	26
Aclarar si los espermatozoides con reacción acrosomal inducida por procaína son los fertilizantes.....	28
La capacidad de adhesión de los espermatozoides con reacción acrosomal sincrónica.....	29
Fertilización polispérmica gradual con espermatozoides tratados con procaína desde el inicio de la incubación.....	31
Posible arresto de reacciones acrosomales posteriores a las inducidas en los primeros 15 minutos de tratamiento con procaína.....	32
Fertilización con espermatozoides tratados con procaína a los 5 minutos de incubación en MCM-PLG y fertilización simultánea con espermatozoides control.....	35
DISCUSION.....	36
Procaína.....	36
Calcio exógeno.....	37
ATP.....	38
Polispermia.....	40
CONCLUSIONES.....	44
BIBLIOGRAFIA.....	46

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

Fertilización.

La fertilización se define como la fusión de las células sexuales, espermatozoide y óvulo, para dar origen a un nuevo individuo de la misma especie. Dada su importancia en la preservación de las especies, la fertilización es tema de numerosas investigaciones, para conocer, las condiciones bajo las cuales se realiza el proceso. Los criterios para valorarla varían: así, se considera que ha habido fertilización si se observa unión y/o fusión de los gametos a nivel de sus membranas plasmáticas (Bedford y Mand Cooper, 1978), descondensación de cabezas espermáticas en el citoplasma del óvulo (Perreault y col. 1986); la formación de pronúcleos (Rogers, 1978) y la singamia previa a la primera división celular son criterios totalmente confiables de una fertilización positiva (Wassermann, 1987).

El conocimiento de la fertilización se inició mediante su estudio en gametos de invertebrados marinos, los cuales exhiben fertilización externa. La observación continua experimental del fenómeno era posible en estos animales por la gran cantidad de gametos que liberan al agua marina.

Sin embargo, muchos de los descubrimientos realizados sobre la fertilización de los invertebrados no era posible extrapolarlos a los mamíferos, dadas

las diferencias en la que ocurre la fertilización en estos últimos. Los mamíferos son organismos con fecundación interna y con pautas conductuales y de cortejo específicas, según la especie. (Yanagimachi, 1988).

En dichos organismos, se han estudiado los ciclos reproductivos, temporadas de apareamiento y capacidad reproductora de diversas especies (número de crías por camada). Por la complejidad que presenta el estudio de la fertilización de los organismos de fecundación interna, se optó por la obtención de sus gametos y el manejo de ellos bajo condiciones *in vitro* (Rogers, 1978). La primera especie en la cual se pudo efectuar la fertilización fue el conejo (Rogers, 1978). Desde entonces la búsqueda ha continuado, y para un gran número de especies se conocen ya las condiciones adecuadas de cultivo para la preparación de sus gametos y la fertilización *in vitro*.

El espermatozoide de los mamíferos

El espermatozoide es el gameto masculino, se origina por la diferenciación de las células germinales (espermatogonias), dentro de los túbulos seminíferos del testículo (Eddy, 1988) y consta de dos componentes principales: cabeza y cola o flagelo.

La cabeza del espermatozoide está formada principalmente por el núcleo en el cual la cromatina está muy compactada, y por el acrosoma. Este organelo originado del aparato de Golgi (Yanagimachi, 1988), se

encuentra en la región anterior del núcleo y se le ha comparado con un lisosoma especializado, debido a que contiene enzimas líticas que le permiten al espermatozoide, librar las barreras protectoras del óvulo. Las enzimas se encuentran contenidas en una matriz acrosomal, que a su vez se encuentra envuelta por una membrana continua denominada como acrosomal interna a la parte cercana a la envoltura nuclear y como membrana acrosomal externa, la parte situada bajo la membrana plasmática del espermatozoide.

El flagelo del espermatozoide ha sido subdividido en pieza media, pieza principal y pieza terminal; la primera se caracteriza por la presencia de la vaina mitocondrial, pieza principal por su capa fibrosa (Fig. 1). El flagelo posee un axonema central formado por un complejo ordenado de microtúbulos, también forman parte del flagelo nueve fibras densas. El axonema, la capa fibrosa y las fibras densas son componentes del citoesqueleto del flagelo (Yanagimachi, 1988). El espermatozoide en general contiene poco citoplasma. Las características morfológicas del espermatozoide de los mamíferos son las antes mencionadas, pero existen diferencias específicas de especie tales como; la variación en el tamaño y en la forma de la cabeza y del acrosoma e igualmente en la longitud y tamaño relativo de los componentes del flagelo. El espermatozoide testicular no posee la capacidad de fertilizar al óvulo; para ello requiere que le ocurran un conjunto de cambios

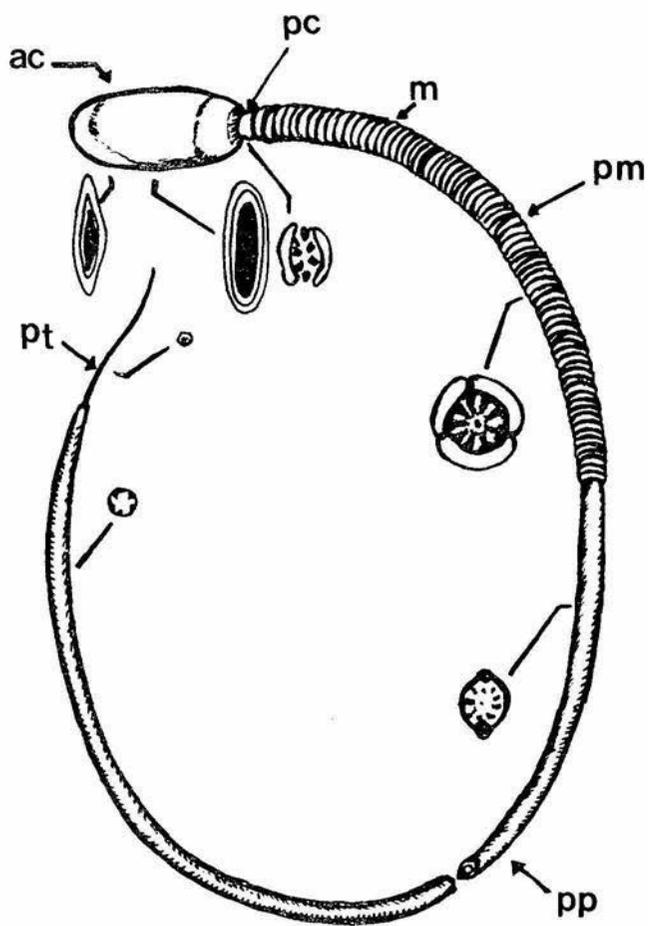


Fig. 1. Estructura del espermatozoide de los mamíferos. ac. acrosoma, pc. pieza de conexión, m. mitocondria, pm. pieza media, pp. pieza principal, pt. pieza terminal. Además se muestra la composición interna de diferentes secciones transversales. Tomado de Setchell, 1982.

durante su viaje por el epidídimo y otros adicionales en el tracto genital de la hembra (Yanagimachi, 1988).

Principales cambios fisiológicos durante la maduración epididimal.

Uno de los procesos de la maduración se efectúa durante el paso del espermatozoide a través de la luz del epidídimo. Los cambios más notables en el espermatozoide maduro son la capacidad de ser reconocido por la zona pelúcida del óvulo (Rogers, 1978; Yanagimachi, 1988). Asimismo, la adquisición de su capacidad para moverse. Los espermatozoides generalmente se encuentran inmóviles en los testículos y no se mueven al ser diluidos en un medio salino. La adquisición de la potencialidad de moverse es gradual, los espermatozoides de la cola del epidídimo, ya se mueven al ser eyaculados o diluidos experimentalmente.

En la iniciación del movimiento espermático han sido involucrados: un aumento, de la concentración de AMPc en el gameto y de la actividad de proteínas cinasas, y se ha observado, que la motilidad no se efectúa cuando los espermatozoides son expuestos a inhibidores de dichas enzimas. El requerimiento del proceso de maduración del espermatozoide fue comprobado por Orgebin-Crist (1986), quien utilizó espermatozoides de la cabeza del epidídimo y mostró incapacidad de dichas células para fertilizar. Otros cambios que han sido observados en el espermatozoide maduro son una alteración en la forma y en el volumen del acrosoma.

Esto ha sido señalado para los espermatozoides del cobayo, del conejo, del elefante y de algunos roedores (Rogers, 1978). Ocurre además, la estabilización de muchas partes del espermatozoide como resultado de la oxidación de grupos sulfhidrilos a puentes disulfuros las en proteínas, esto le confiere una gran resistencia a las estructuras que los contienen.

También se señalan como parte de la maduración epididimal, una reducción de lípidos, así como un aumento de la fluidez de la membrana (Huang, Kosower, y Yanagimachi, 1984).

Capacitación del espermatozoide.

Con el nombre de la "capacitación" se designa al conjunto de cambios, que sufre el espermatozoide eyaculado dentro del tracto reproductor femenino, con el fin de completar su preparación y transformarse en el gameto fertilizante (Rogers, 1983). Dicho proceso fue descubierto independientemente por Chang (1951) y Austin (1952).

El espermatozoide inicia su capacitación a partir del sitio donde es depositado el semen en la hembra y puede darse desde el cérvix hasta el oviducto. Aparentemente no existen sustancias definidas que induzcan la capacitación espermática, aunque se ha planteado, la participación de algunas proteinasas.

Ha sido posible capacitar experimentalmente a espermatozoides de varias especies, mediante la utilización de medios de incubación químicamente

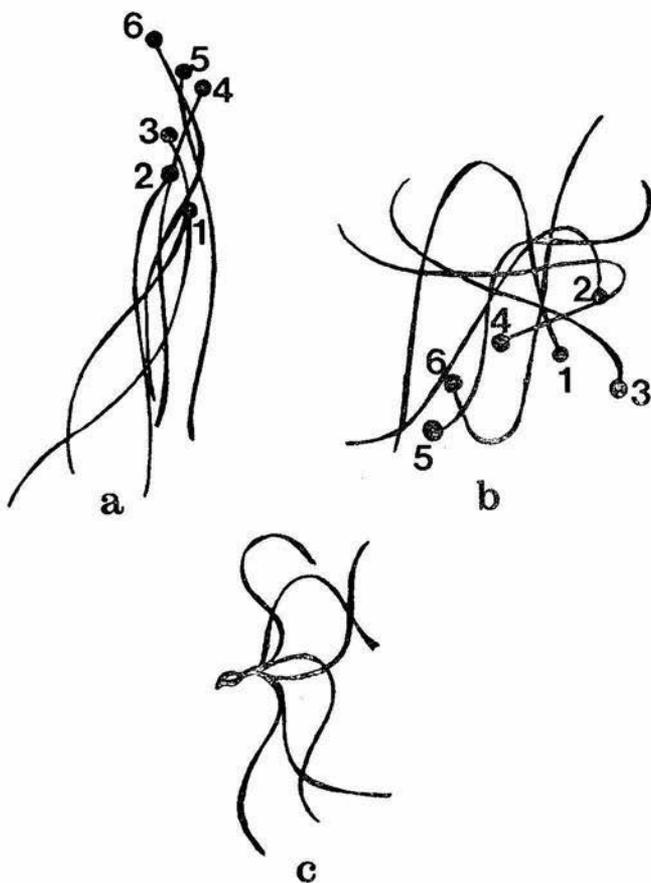


Fig. 2. Representación del movimiento hiperactivado del espermatozoide. a) espermatozoides inmóviles y b) espermatozoides con movimiento hiperactivado, notese la presencia de una amplia curvatura flagelar. Tomado de Yanagimachi, 1981. c) Espermatozoide del hámster hiperactivado. Tomado de Mohri, et al., 1989.

definidos. El tiempo de capacitación *in vitro* varía con la especie; dos horas para el cobayo, 5-7 horas para los espermatozoides del hombre (Rogers, 1978). Durante la capacitación se ha observado estabilidad nuclear, y de los organelos; no se presenta distorsión mecánica originada por el progresivo y gradual aumento del movimiento, pero sí existe una alteración de la composición de los lípidos de la membrana (Chang, 1984), lo que origina variaciones en la fluidez de la misma.

En los espermatozoides capacitados de varias especies se ha podido observar un patrón de motilidad característico denominado "motilidad hiperactivada", que consiste en un movimiento flagelar frenético, y de curvatura amplia. Este movimiento fue descrito para el espermatozoide del hámster por Yanagimachi (1981) y posteriormente se ha corroborado en otras especies (Suarez, y col. 1991). El movimiento hiperactivado se presenta en el espermatozoide capacitado previo a la reacción acrosomal (Fig. 2).

Reacción acrosomal.

El óvulo de los mamíferos posee dos estructuras que lo cubren, éstas son el "cumulus oophorus" formado por las células de la granulosa y la zona pelúcida que es acelular, y está formada por glucoproteínas. Ambas estructuras constituyen barreras para el espermatozoide fertilizante, el cual para poder fusionarse con la membrana plasmática del óvulo

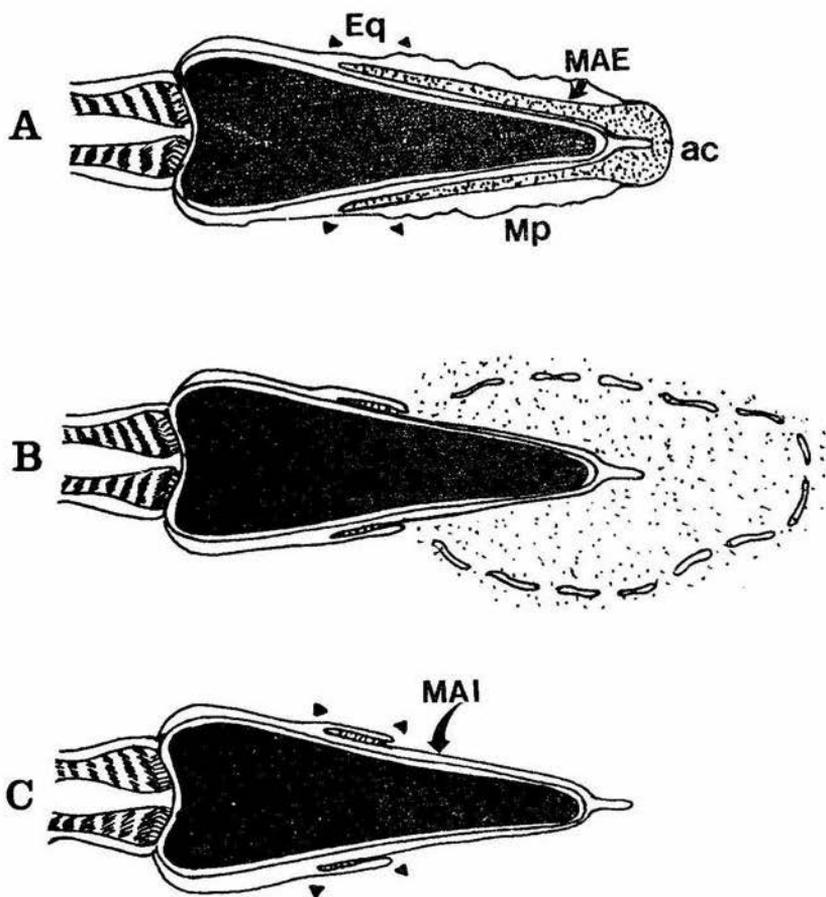


Fig. 3. Diagrama que representa el proceso de la Reacción Acrosomal. A) Eq. Región ecuatorial, ac. Acrosoma. B) Fusión de la membrana acrosomal externa (MAE) y la membrana plasmática (MP) y liberación del contenido acrosomal. C) Exposición de la membrana acrosomal interna (MAI). Tomado de Yanagimachi, 1988.

requiere atravesarlas. Para ello, el gameto debe sufrir la reacción acrosomal, proceso por el cual se liberan las enzimas hidrolíticas, que le ayudarán a su paso a través de ambas cubiertas.

La reacción acrosomal (RA) (Fig.3) es un fenómeno que involucra la fusión de la membrana acrosomal externa con la membrana plasmática que la cubre; con la producción de pequeñas vesículas que se separan del espermatozoide y la liberación de las enzimas acrosomales. La membrana acrosomal interna persiste, y al parecer participa activamente en la fusión del espermatozoide con el óvulo en muchas especies (Bedford y col. 1979; Huang y Yanagimachi, 1985). En los espermatozoides de invertebrados marinos la reacción acrosomal ocurre instantáneamente, cuando el espermatozoide hace contacto con la gelatina del óvulo sin la necesidad de una capacitación del gameto masculino (Epel, 1990). En el caso de los mamíferos la reacción acrosomal natural se produce sólo cuando el espermatozoide se encuentra capacitado. Barros y colaboradores en 1967 fueron los primeros en describir la reacción acrosomal y su importancia en la fertilización (Barros y Yanagimachi, 1971).

Algunas de las enzimas acrosomales únicas de los espermatozoides de los mamíferos son: la acrosina, con propiedad para disolver a la zona pelúcida del óvulo (Fig. 4). La acrosina esta presente en el espermatozoide como proacrosina, la cual se convierte a su forma activa durante la reacción acrosomal (Mack

y col., 1983; Yanagimachi, 1988). La hialuronidasa, otra enzima específica, es utilizada por el espermatozoide para disgregar a las células de la granulosa que forman la envoltura externa del ovocito (Eddy, 1988; Talbot, 1984).

La reacción acrosomal bajo condiciones experimentales se ha logrado en los espermatozoides de muchas especies (Liu y Baker, 1990). En los espermatozoides del cobayo ocurre cuando los gametos son incubados en medios salinos con sustratos energéticos. Su capacitación puede ocurrir en medio libre de calcio, pero la reacción acrosomal es totalmente dependiente de la presencia del ión en el medio (Collins y Epel, 1977; Feng, Bhattachayya y Yanagimachi, 1988). Así, Yanagimachi y Usui en 1984 informaron, que en los espermatozoides del cobayo preincubados, en ausencia de calcio, la reacción acrosomal se presenta a los pocos minutos (6-10 min) de la adición de calcio al medio de incubación. Los espermatozoides del cobayo tienen un acrosoma prominente y la reacción acrosomal puede ser fácilmente distinguida por microscopía de luz a bajo aumento (100x).

Los estudios realizados para conocer cómo se efectúa la reacción acrosomal en estos espermatozoides, han aclarado la función de varios iones y sustancias como participantes u optimizadores del proceso.

En las investigaciones para determinar el papel

o la función del calcio en la reacción acrosomal, se ha visto involucrado al ión junto con diversas enzimas. Utilizando técnicas citoquímicas, se demostró la presencia de una ATPasa dependiente de magnesio en la membrana acrosomal externa y en la región interna de la membrana plasmática, esta enzima mantiene su actividad durante la capacitación en un medio sin calcio, y es inactivada 20 segundos después de la adición de calcio al medio (Feng, Bhattachayya y Yanagimachi, 1988). La inactivación de la ATPasa por calcio se considera, que puede ser el evento inicial para la reacción acrosomal (Breitbart, Rubistein y Nass-Arden, 1985). Igualmente se sugiere, que el calcio que ha penetrado a la membrana espermática puede activar fosfolipasas, éstas inducen la formación de ácidos grasos y lisofosfolípidos (compuestos que se consideran fusogénicos) a partir de los fosfolípidos, lo que facilitaría la fusión de las membranas y así ocurriría la reacción acrosomal (Ono, Yanagimachi y Huang Jr. 1982).

El óvulo.

El óvulo es la célula sexual femenina fertilizable y se origina en los ovarios. El óvulo es el producto de la diferenciación de la células germinales denominadas ovogonias, durante el proceso conocido como ovogénesis (Wassermann, 1988).

A partir de las células germinales primordiales que se multiplican por mitosis y colonizan a los

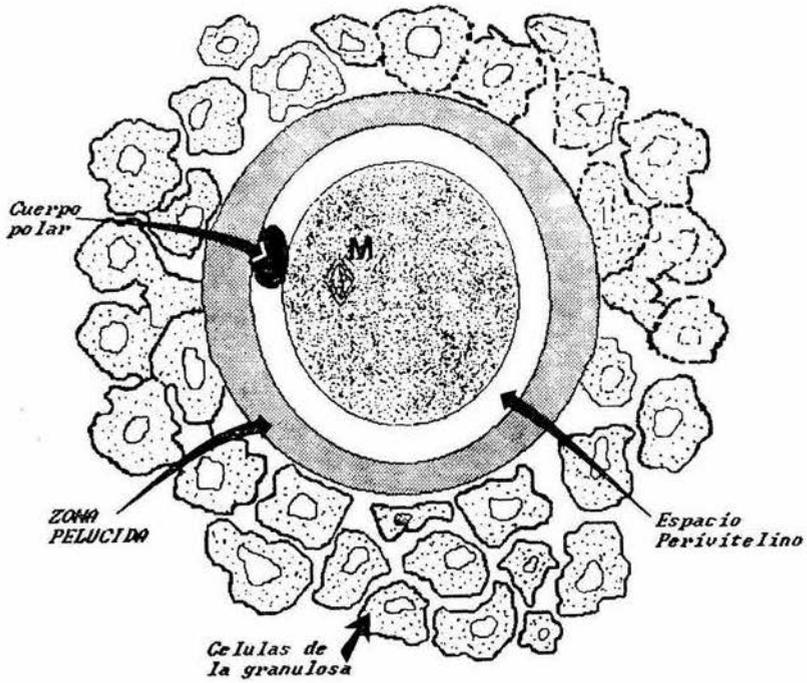


Fig.4. Representación del cumulus oophorus de los mamíferos.

Se muestran las principales estructuras del óvulo: cuerpo polar, zona pelúcida, espacio perivitelino, células de la granulosa y núcleo en metafase. Cortesía Biol. R.A. Valdez.

primordios gonadales, en el ovario se originan las ovogonias las cuales por medio de la meiosis se transforman en el óvulo. En el ovario de la hembra, al nacimiento existe una cantidad finita de células sexuales, ovocitos arrestados en la profase de la primera división meiótica. En las hembras sexualmente maduras, durante la ovulación, se liberan del ovario ovocitos en la metafase de la segunda división meiótica. La célula liberada está lista para ser fertilizada y recibe el nombre de óvulo. El número de óvulos y la periodicidad con que son liberados son características de cada especie.

Características estructurales del óvulo.

El óvulo presenta un núcleo haploide arrestado en metafase de la segunda división meiótica y en ella se mantiene a menos de que sea activado naturalmente por el espermatozoide durante la fertilización (Fig. 4). Si ésta ocurre, la meiosis se reanuda y se completa por la expulsión del segundo cuerpo polar. El óvulo es una célula muy grande de 80 100 μm de diámetro, presenta en su citoplasma gran cantidad de mitocondrias, un aparato de Golgi que origina como resultado de sus secreciones, la formación de la zona pelúcida (ZP), que está constituida principalmente de glucoproteínas (Yanagimachi, 1984; Yanagimachi, 1988; la ZP es considerada como barrera para la fertilización entre diferentes especies (Rogers, 1983). Los gránulos corticales son organelos

característicos del óvulo, que se encuentran dispuestos bajo la membrana plasmática del mismo. Estos gránulos contienen proteinasas, las cuales son liberadas por exocitosis hacia el espacio perivitelino en respuesta a la fertilización (Kline, 1991) (Fig. 4).

El óvulo se encuentra rodeado por el "cumulus oophurus", una multicapa células de la granulosa, que circunda a la zona pelúcida. Las células de la granulosa están unidas entre sí por ácido hialurónico. La corona radiada es parte del cumulus, está constituida por las células más cercanas al óvulo y que se conectan con el óvulo mediante procesos que atraviesan la zona pelúcida, hasta hacer contacto con la membrana plasmática del óvulo (Yanagimachi, 1988; Dekel, 1988).

La zona pelúcida es la envoltura del óvulo más próxima a él, y está constituida por tres glicoproteínas principales (ZP1, ZP2 y ZP3). Se ha señalado que la ZP3 determina la especificidad de especie y en varias es además el inductor de la reacción acrosomal del espermatozoide. La zona pelúcida también participa en el bloqueo a la polispermia (Stewart-Savage y Bavister, 1988; Wentz, y col. 1983).

Maduración de los ovocitos

Por definición, la maduración del ovocito se inicia con la reanudación de la división meiótica de las células arrestadas en el diploteno de la primera división dando origen a los ovocitos en metafase de la segunda división meiótica, estadio en el que serán ovulados. El proceso es dependiente de las hormonas de origen hipofisiario, de la hormona luteinizante (LH) y de la hormona folículo estimulante (FSH) (Wassermann, 1988).

La maduración de los ovocitos comienza a partir de que la hembra llega a la pubertad. Es un proceso cíclico, y en cada ciclo un número finito de ovocitos es ovulado en metafase II y en estado arrestado. La maduración continúa si el ovulo es fertilizado y termina con la expulsión del segundo cuerpo polar. La hembra ovula, periódicamente, hasta que la reserva de ovocitos del ovario se agota. En la mujer, este estado fisiológico se conoce como menopausia.

Interacción espermatozoide-óvulo

La fertilización se designa como la fusión de los gametos a nivel de sus membranas plasmáticas. Se ha señalado, que la fusión de los óvulos desnudos del hámster con espermatozoides con reacción acrosomal, se efectuaba a nivel de la región postacrosomal del espermatozoide. Sin embargo, en la fertilización de óvulos intactos el sitio de fusión del espermatozoide

es aparentemente el segmento ecuatorial (Bedford, Moore y Franklin, 1979; Huang y Yanagimachi, 1985) (Fig. 5).

Bloqueo a la polispermia

Normalmente el óvulo es fertilizado sólo por un espermatozoide. En el bloqueo a la polispermia participa la zona pelúcida (Stewart-Savage y Bavister, 1988).

Después de ocurrida la fertilización, casi de inmediato la zona pelúcida sufre cambios, los cuales colectivamente son llamados "reacción de la zona".

Los cambios en la zona pelúcida son el resultado de la reacción cortical. El proceso de reacción cortical ocurre por la exocitosis de los gránulos corticales. El fenómeno involucra la fusión de los gránulos corticales del óvulo con la membrana plasmática del mismo, y la expulsión del contenido de los gránulos al espacio perivitelino (Wentz y col. 1983).

Dentro de los constituyentes de los gránulos se incluyen diversas enzimas que difunden a la zona pelúcida y causan modificaciones en ella; se alteran los receptores que reconocen a los espermatozoides, la estructura de la zona pelúcida se endurece, para evitar que los espermatozoides que ya se encuentran en su interior, continúen a través de ella y lleguen al espacio perivitelino.

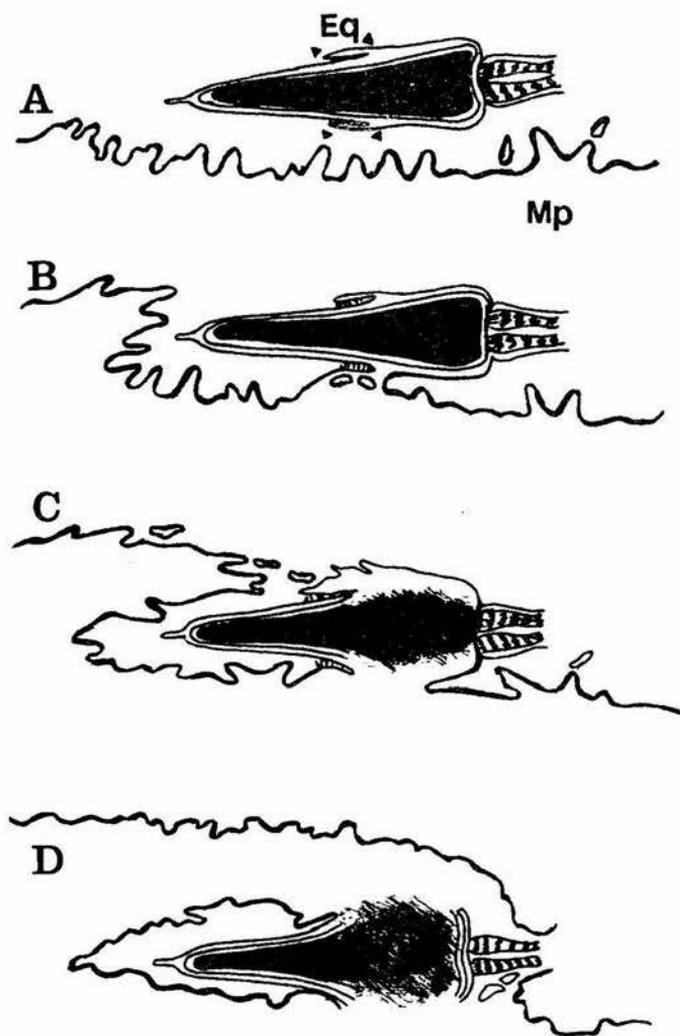


Fig. 5. Principales eventos de la fusión espermatozoide-óvulo. A) Espermatozoide con reacción acrosomal y la membrana plasmática del ovocito (MP). Eq, segmento ecuatorial. B) y C) Fusión de las membranas plasmáticas de ambos gametos. D) Internalización del espermatozoide por las microvellosidades del óvulo. Tomado de Yanagimachi, 1988.

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

El movimiento del espermatozoide es regulado por el estado fisiológico que guarda. Así, durante la maduración el espermatozoide adquiere la capacidad de moverse de manera paulatina, tornándose a un movimiento progresivo previo a la eyaculación.

También se ha determinado que la movilidad espermática juega un papel indispensable para la fertilización y que es la movilidad hiperactivada con reacción acrosomal, la que le permite atravesar la zona pelúcida y llegar a la membrana plasmática del óvulo para fusionarse con ella (Burks y Saling, 1992). La motilidad hiperactivada se presenta en los espermatozoides casi al finalizar su proceso de capacitación y previo a la presentación de la reacción acrosomal.

En condiciones experimentales se ha podido capacitar espermatozoides de diversas especies: hámster, rata, ratón, ser humano y cobayo entre otras (Rogers, 1978). También, la reacción acrosomal del espermatozoide, un fenómeno dependiente de calcio, ha sido inducida en varias especies mediante el uso de agentes transportadores del catión; como el ionóforo de calcio A23187 (Liu y Baker, 1990); la capacidad fertilizante de estos espermatozoides con reacción acrosomal inducida se valoró en un sistema de

fertilización heteróloga utilizando óvulos del hámster sin zona pelúcida. No obstante, el uso de los ionóforos origina conforme transcurre el tiempo, que la movilidad y viabilidad de los espermatozoides disminuya (Liu y Baker, 1990; Placjot y col., 1984).

En 1983, Singh y colaboradores informaron un cambio en la movilidad de los espermatozoides del bovino, al incubarlos en presencia de dibucaína, un anestésico local. El fármaco alteró el movimiento lineal inicial, entre 60% - 70% de las células, transformándolo en un bateo de amplia curvatura flagelar y con desplazamiento de la cabeza trazando un patrón de ochos, característico del movimiento hiperactivado descrito por Yanagimachi (1981).

Por otra parte, Lindemann y colaboradores (1987) mostraron un cambio en la movilidad de los espermatozoides epididimales de la rata, originado por la adición del anestésico local procaína, el cambio que se manifestó fue un movimiento con patrón circular, con un considerable incremento de la movilidad y longevidad celular. En nuestro laboratorio, al realizar estudios para poder conocer la acción de la procaína en los espermatozoides del cobayo, se encontró que la adición de procaína a una concentración final de 5mM al inicio de la incubación, a espermatozoides suspendidos en el medio mínimo de cultivo, con lactato, piruvato y glucosa (MCM-PLG) les produce un movimiento hiperactivado (Mújica, y col., en prensa) y además les indujo la

presentación temprana de la reacción acrosomal. La procaína induce no sólo el movimiento hiperactivado sino también una reacción acrosomal sincrónica, cuando el anestésico se añade a los espermatozoides incubados durante un tiempo más prolongado. Los dos procesos espermáticos alterados por la procaína ocurrieron de manera sincrónica y en un porcentaje elevado de espermatozoides; dichas características son ideales para el estudio de tales procesos.

OBJETIVOS.

En este trabajo, consideramos importante conocer, si la aparente reacción acrosomal inducida por procaína producía espermatozoides fertilizantes.

Si se pudiera demostrar su capacidad fertilizante se contaría: a) con un modelo espermático en el cual su manejo en tiempo se reduciría; el resultado principal sería espermatozoides menos envejecidos. b) Adicionalmente se podría programar el tiempo exacto de fertilización de los óvulos, evitando el envejecimiento de éstos y se podría calcular de manera más exacta el tiempo de inicio de procesos subsecuentes a la fusión de los gametos.

M E T O D O L O G I A

Superovulación y obtención de los óvulos del hámster.

Se utilizaron hembras hámster vírgenes de mes y medio de edad y se las indujo a superovular, mediante la administración por vía subcutánea o intraperitoneal de 50 UI de gonadotropina coriónica de yegua preñada (PMSG; Folligon, Intervet) diluída en agua destilada estéril, seguida 56 horas más tarde, de 50 UI de gonadotropina coriónica de orina de mujer embarazada (hCG; Sigma), por la misma vía de administración. (Fleming y Yanagimachi, 1980). Después de 18-20 horas de la inyección de hCG se procedió al sacrificio de los animales, por dislocación cervical o por anestesia con cloroformo.

Se extrajo el complejo ovario-oviducto-útero, del cual se retiró la grasa e irrigaciones venosas. Se localizó la región del oviducto, y de éste, se puncionó la región más congestionada; para permitir que los óvulos rodeados de las células de la granulosa fueran expulsados. A simple vista se observan como una nube, la cual fue aspirada con una pipeta Pasteur conteniendo el medio de incubación que iba a ser utilizado, MCM-PL (NaCl 105.08 mM, NaHCO₃ 25.07 mM, CaCl₂ 1.71 mM, piruvato de sodio 0.24 mM, lactato de sodio 20.0 mM pH = 7.4) complementado con albúmina

(MCM-PLA), de suero de bovino fracción V (6 mg por ml del medio). También se trabajó con el Tyrode (NaCl 116.73 mM, MgCl₂ 0.49 mM, NaHCO₃ 11.9 mM, KCl 2.8 mM, CaCl₂ 1.8 mM, lactato de sodio 20.0 mM, piruvato de sodio 0.25 mM, glucosa 5.56 mM, K₂PO₄ 0.36 mM pH = 7.6) suplementado con albúmina de suero de bovino fracción V (6 mg/ml) (Tyrode-A) (Rogers, y Yanagimachi, 1975).

La nube celular se lavó varias veces por su paso a gotas sucesivas del medio seleccionado colocadas en portaobjetos excavados.

Obtención de los óvulos desnudos.

A las nubes celulares lavadas como se indicó en el párrafo anterior se les adicionó hialuronidasa, al 0.01% en MCMPL-A o Tyrode-A, con el fin de disgregar a las células que rodean a los óvulos. Los óvulos observados bajo microscopio (100x), fueron separados de las células de la granulosa por aspiración con una micropipeta, la cual contenía el medio de coincubación seleccionado y se lavaron varias veces por transferencia sucesiva de una gota a otra del medio. De esta manera, los óvulos quedaron liberados de las células de la granulosa.

En seguida se retiró la zona pelúcida del óvulo por un tratamiento enzimático con una solución de tripsina al 0.01% en medio de coincubación. Una vez disuelta la zona pelúcida, se transfirieron rápidamente los óvulos a una gota con inhibidor de la tripsina al 0.015% en el medio de coincubación, para

detener la acción de la enzima y evitar su acción sobre el óvulo mismo. En seguida, se lavó de manera exhaustiva a los ovocitos, por transferencia a gotas sucesivas del mismo medio. En este momento, los óvulos se encontraban listos para su inseminación con los espermatozoides a ensayar (Labra, 1990) y se mantuvieron a 37°C (menos de una hora) en una cámara húmeda en la parte excavada de un portaobjetos, hasta su inseminación.

Obtención y lavado de los espermatozoides.

Se utilizaron cobayos machos adultos de aproximadamente 700 gramos de peso, los cuales se sacrificaron por dislocación cervical o por administración de 2 ml de pentobarbital (0.126 g) por vía intraperitoneal. Se extrajeron los complejos testículo-epidídimo-conductos deferentes los cuales se lavaron en una solución de NaCl al 0.9% a 37° C. Del conducto deferente, se retiraron la grasa y vasos sanguíneos. Los espermatozoides se extrajeron por la inyección de 2 ml de NaCl al 0.9%, en el interior del conducto. Las células se colectaron por centrifugación, se lavaron 2 veces por resuspensión y centrifugación (500 g, 4 min.) en solución salina. Después del segundo lavado, se tomó una muestra alícuota de 0.05 ml de la suspensión de espermatozoides, se les añadió 1 ml de una solución de Tritón X-100 al 0.1% en PBS (NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g, KH_2PO_4 , 0.2 g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, CaCl_2 0.1 g, Na_2HPO_4

1.15 g/l pH = 7.4), la mezcla se agitó en vórtex y se tomó una pequeña alícuota para el conteo celular en la cámara de Neubauer. La suspensión restante de espermatozoides se dividió en dos, las células se colectaron por centrifugación y se resuspendieron en un volumen adecuado del medio seleccionado para su incubación.

Inducción de la reacción acrosomal por procaína e inseminación de los óvulos.

Los espermatozoides lavados en NaCl (35×10^6 células) fueron incubados a 37°C en un baño de agua, resuspendidos en un ml del medio MCM-PL, o en MCM-PL más glucosa (5.56 mM) (MCM-PLG) muestra control y experimental, respectivamente.

La motilidad en ambas muestras fue observada, al microscopio de luz, al inicio y a intervalos de tiempo durante el periodo total de incubación. En general, a los 30 minutos de iniciada la incubación se añadió procaína a los espermatozoides incubados en MCM-PLG a una concentración final 5 mM (procaína stock 200x, preparada en MCM-PLG). La reacción acrosomal se valoró cualitativa y cuantitativamente, como se describirá enseguida. La RA se presentó dentro de los primeros 15 minutos de adicionada la procaína, a este tiempo se tomaron 10 μl de la suspensión y con ellos se inseminaron los óvulos desnudos del hámster. El tiempo de adición de la procaína se varió en algunos experimentos, así como el de coincubación y se

especifica en cada caso.

Por otra parte, los espermatozoides control en MCM-PL se dejaron en incubación, hasta que de manera espontánea y gradual se presentó la reacción acrosomal. Cuando el porcentaje de reacción acrosomal fue similar al mostrado por el grupo experimental, se inseminó a otro lote de óvulos desnudos del hámster.

Valoración de la reacción acrosomal en los espermatozoides del cobayo.

La reacción acrosomal de los espermatozoides se valoró cualitativamente como positiva, cuando en la muestra se pudo observar la presencia de espermatozoides sin acrosoma y con movimiento hiperactivado. El acrosoma del espermatozoide del cobayo es conspicuo y fácilmente distinguible observando al microscopio a bajo aumento (100x).

La valoración cuantitativa se hizo en espermatozoides fijados en formaldehído al 3% en PBS; de muestras obtenidas a los pocos segundos y a los 15 minutos de añadida la procaína; y de las muestras control sin procaína fijadas a los tiempos apropiados. Se evaluó de manera aleatoria en un mínimo de 200 espermatozoides, la presencia o ausencia del acrosoma y se calculó el porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal mediante la siguiente fórmula:

$$\% RA = \frac{\# \text{ espermatozoides sin acrosoma} \times 100}{\# \text{ total de espermatozoides contados (200)}}$$

Valoración de la fertilización.

Para valorar la fertilización se utilizaron dos métodos:

1) La observación de los óvulos vivos por microscopía de contraste de fases. Con esta técnica, el criterio de fertilización positiva fue la presencia de espermatozoides o de cabezas espermáticas en proceso de descondensación dentro del óvulo.

2) La observación de la presencia de cabezas espermáticas en el interior de los ovocitos fijados y teñidos con el reactivo de Hoechst 33258 por microscopía de fluorescencia (Critser y First, 1986; Mori y col., 1988; Sawicki y Mystkoska, 1990).

La fertilización se consideró positiva si se observaban cabezas espermáticas brillantes dentro de los óvulos. Para ello, al finalizar la coincubación, los óvulos se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS; se adicionaron unas gotas del fijador en el portaobjetos que contenía a los gametos en interacción. El tiempo mínimo de fijación fue de 24 horas y el máximo de 78.

El fijador se retiró mediante el lavado de los óvulos en PBS, por tres transferencias a gotas sucesivas. Los residuos de paraformaldehído se neutralizaron mediante la incubación de los óvulos en una solución de NH_4Cl 0.05 M en PBS, por 10 minutos. Los óvulos se volvieron a lavar en DPBS, tres veces.

Tinción de los óvulos con el reactivos de Hoechst.

Los óvulos fijados se permeabilizaron por tratamiento con acetona a -20°C durante 7 minutos, y se lavaron en DPBS tres veces por transferencia a gotas sucesivas. Se resuspendieron en $300\ \mu\text{l}$ de PBS, se les adicionaron $50\ \mu\text{l}$ del reactivo de Hoechst 33258 (de una solución stock de $200\ \text{mg/ml}$ diluida 1:100 en PBS), y se incubaron por 10 minutos en una cámara húmeda a temperatura ambiente.

Los óvulos se lavaron exhaustivamente en agua bidestilada por transferencia de una gota a otra y se colocaron en un portaobjetos normal con $15\ \mu\text{l}$ de una solución de citrato-fosfato (ácido cítrico $0.1\ \text{M}$, Na_2HPO_4 $0.2\ \text{M}$ $\text{pH} = 5.5$) en PBS. Se colocó sobre la pequeña gota un cubreobjetos y se sellaron sus bordes con esmalte transparente de uñas (Labra, 1990).

Para las observaciones de los óvulos se utilizó microscopía de epifluorescencia, el reactivo de Hoechst fluoresce a $365\ \text{nm}$. Se empleó un objetivo de $40\times$ y se utilizó un filtro de excitación ultravioleta. Los óvulos fueron fotografiados mediante una cámara Reflex de $35\ \text{mm}$ adaptada a un microscopio Zeiss ---. Se utilizó un película Tri X Pan asa 400 o Plus X 125 para fotografía en blanco y negro. Las fotografías se imprimieron en papel Kodabrome F_3 de alto contraste.

R E S U L T A D O S

Inducción de la reacción acrosomal por procaína.

Los espermatozoides del cuyo incubados en MCM-PLG en presencia de 5 mM de procaína, presentaron de inmediato, un movimiento singular en un alto porcentaje de la población, como ya había sido comunicado (Mújica y col. 1993), cuyas características concuerdan con las descritas para el movimiento hiperactivado (Yanagimachi, 1988) y 30 minutos más tarde se observaron espermatozoides con reacción acrosomal. La presentación de este fenómeno ocurrió de manera temprana; ya que la reacción acrosomal en los espermatozoides incubados en MCM-PLG generalmente se presenta después de cuando menos 2 horas de incubación (Rogers y Yanagimachi, 1975).

En este trabajo, se evaluó el efecto de la adición de procaína a otros tiempos de incubación, de los espermatozoides en MCM-PLG y se encontró, que a partir de los 5 minutos de iniciada la incubación, la adición de la procaína les producía de inmediato el cambio en su movilidad, de lineal, dada por la glucosa (Mújica, y col. 1991), se transformó en el movimiento hiperactivado. Además, la procaína produjo en los siguientes 15 minutos de la adición del anestésico, una reacción acrosomal aparente en un número

considerable de espermatozoides, variable de muestra a muestra.

La presentación de la reacción acrosomal, inducida por procaína, fue dependiente de calcio exógeno; no así el movimiento hiperactivado (Mújica, y col. en prensa).

Generalmente, cuando la procaína se añadió a los 30 minutos de incubación produjo, en los siguientes 15 minutos generalmente, un alto porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal típica, es decir, sin acrosoma y con bateo flagelar de látigo y describiendo con la cabeza una figura irregular en forma de ocho (Yanagimachi, 1981). Bajo estas condiciones, los valores de reacción acrosomal obtenidos de seis experimentos diferentes fueron, 49, 8, 42, 70, 40, y 72 %. El incremento de reacción acrosomal después de los 15 minutos ya no fue tan notable, por lo tanto se seleccionó la adición de procaína a los 30 minutos de incubación para producir en los espermatozoides la reacción acrosomal y 15 minutos de interacción con ella antes de inseminar a los óvulos (de aquí en adelante podemos referirnos a ella como reacción acrosomal sincrónica), cuya capacidad fertilizante nos interesaba conocer.

Determinación de la capacidad fertilizante de los espermatozoides con reacción acrosomal producida por procaína.

Para la valoración de la capacidad fertilizante

de los espermatozoides se utilizó la técnica de fertilización heteróloga empleando óvulos desnudos del hámster (Véase Métodos). Con la muestra de espermatozoides tratados con procaína con reacción acrosomal sincrónica se inseminó a los óvulos, la coincubación se realizó en el medio MCM-PLGA (ver Métodos) y se terminó por la adición de paraformaldehído a las 2, 3 y 4 horas de la inseminación; cada tiempo se ensayó por separado.

Una fertilización con espermatozoides con reacción acrosomal espontánea (control), incubados en MCM-PL sin glucosa ni procaína se corrió en cada experimento. Con los espermatozoides control fue necesario desfasar la coincubación, desde 90 hasta 140 minutos, en los experimentos mostrados en la Fig. 1., ya que en MCM-PL la presentación de la reacción acrosomal no es sincrónica ni ocurre a un tiempo definido. Lo que se intentó fue inseminar cuando el control ya presentara espermatozoides con reacción acrosomal.

Se encontró fertilización positiva en los dos lotes de óvulos, en los controles (Fig. 6) y en los experimentales (Fig. 7), éstos, inseminados con espermatozoides tratados con procaína. En ambos, la fertilización fue polispérmica y un mayor número de espermatozoides penetraron en los óvulos experimentales, además, se presentó heterogeneidad en el grado de descondensación de las cabezas espermáticas. También fue aparente que conforme se

prolongó el tiempo de coincubación de los gametos el número de cabezas espermáticas dentro del óvulo se incrementó así como el grado de descondensación en ellas.

Efecto de la procaína sobre la polispermia.

En un estudio realizado por Ahuja (1982), él mostró, que el tratamiento de los óvulos con procaína (3-5 mM) interfería con el bloqueo a la polispermia. Se realizaron experimentos para determinar, si la mayor polispermia observada en los óvulos inseminados con espermatozoides tratados con procaína, se debía a la presencia del anestésico, transferido a los óvulos durante la inseminación.

Después del tratamiento con procaína, para inducirles la reacción acrosomal los espermatozoides fueron lavados dos veces por centrifugación-resuspensión en MCM-PLG sin procaína. De la suspensión se transfirieron 10 μ l a 300 μ l de medio de coincubación, que contenía a los óvulos. La concentración final de procaína en el medio de coincubación fue de 1×10^{-6} M, mil veces menor a la concentración que parece afectar a los ovocitos (Ahuja, 1982).

En la Fig. 8 se muestra, que los espermatozoides en los que se retiró la procaína antes de la coincubación produjeron el mismo grado de polispermia (No. de espermatozoides/óvulo) que aquellos que no fueron lavados previamente.

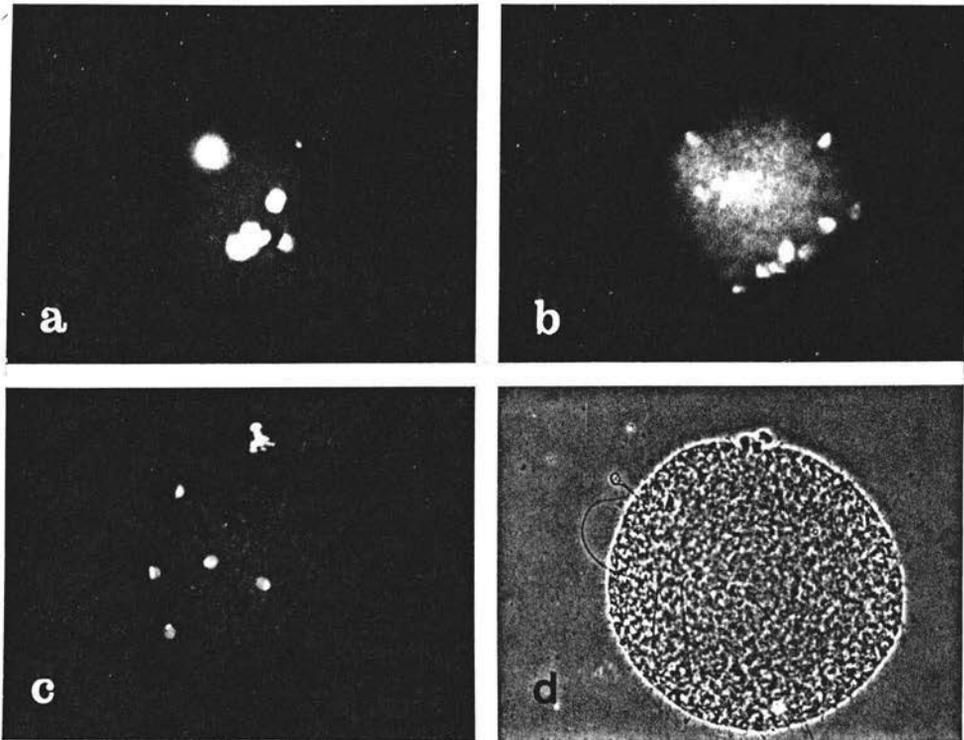


Fig. 6. Ovulos inseminados con espermatozoides con reacción acrosomal espontánea que fueron capacitados en el medio MCM-PL. La co-incubación de los gametos se realizó en medio MCM-PLA durante: a) 3 horas; b) 4 horas, c) y d) 2 horas. La fluorescencia está dada por tinción con Hoechst 33258 (a, b y c); d) contraste de fases de c. Se aprecia polispermia a los tres tiempos ensayados y mayor grado de descondensación de los núcleos espermáticos en los tiempos más prolongados de co-incubación.

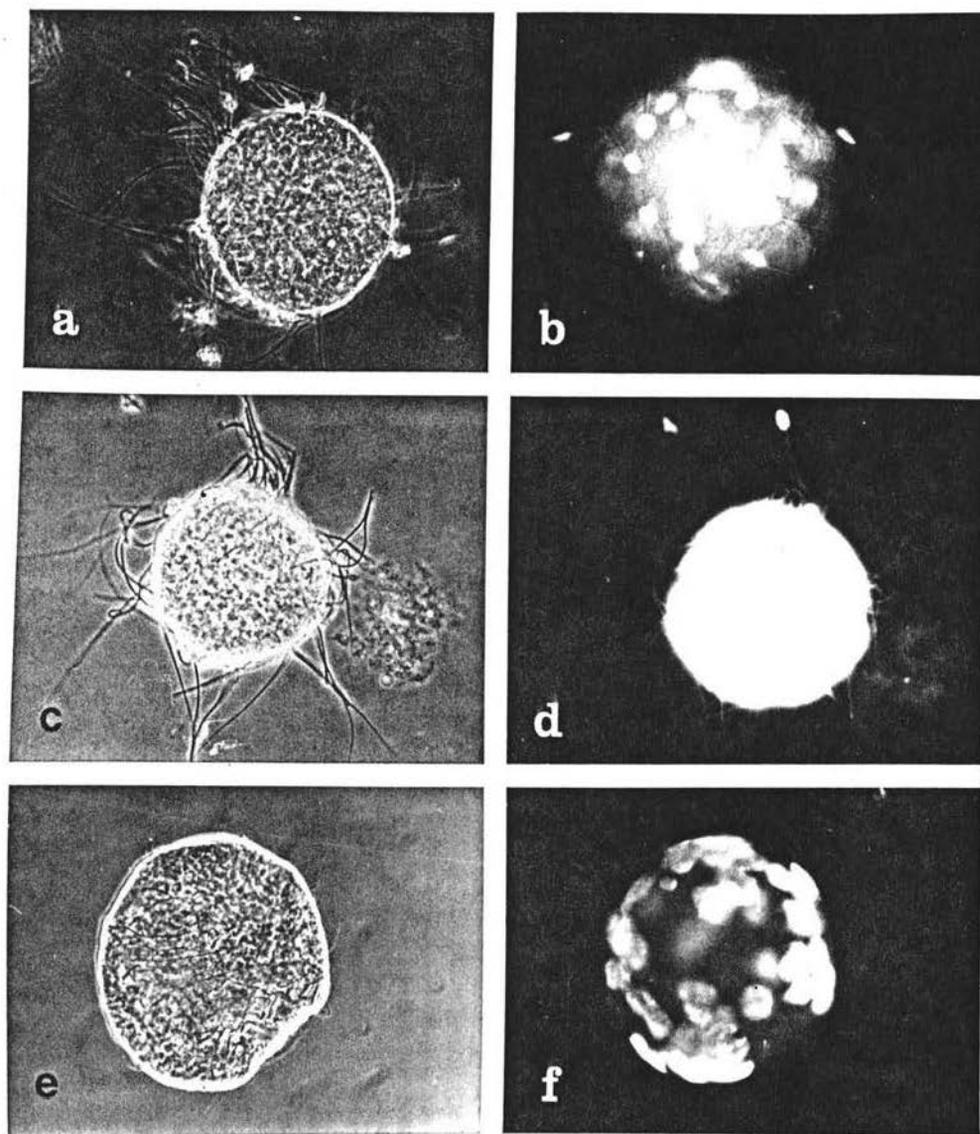


Fig. 7. Ovulos inseminados con espermatozoides con reacción acrosomal sincrónica producida por procaina, durante su capacitación en el medio MCM-PLG. La coincubación se realizó en medio MCM-PLA durante: a) y b) 2 horas; c) y d) 3 horas; e) y f) 4 horas. contraste de fases y fluorescencia respectivamente. La tinción se realizó con Hoechst 33258. Puede apreciarse una gran polispermia y descondensación similar en varios espermatozoides, a un tiempo dado y mayor descondensación de los núcleos espermáticos a las 4 horas de coincubación.

Análisis adicional para aclarar si los espermatozoides con reacción acrosomal inducida por procaína son los fertilizantes.

Con objeto de aclarar si la fertilización observada durante dos horas de coincubación, se debía a los espermatozoides con reacción acrosomal inducida por la procaína y no a espermatozoides que hubieran sufrido la reacción acrosomal durante las dos horas de coincubación, se ensayaron varias condiciones: 1) la capacidad de adhesión (fusión) temprana de los espermatozoides con reacción acrosomal sincrónica; 2) la fertilización polispérmica gradual con espermatozoides tratados con procaína desde el inicio de la incubación; 3) el posible arresto de reacciones acrosomales posteriores a las inducidas por procaína. 4) fertilización durante coincubación muy corta con espermatozoides tratados con procaína a los 5 minutos de incubación en MCM-PLG; 5) inducción de la reacción acrosomal sincrónica a los 5 minutos de incubación en MCM-PLG, e inseminación simultánea con estos espermatozoides y con los control, coincubados en Tyrode-PLGA.

1) La capacidad de adhesión de los espermatozoides con reacción acrosomal sincrónica. Los óvulos se dejaron interaccionar con los espermatozoides con reacción acrosomal espontánea o reacción acrosomal inducida por procaína. Después de

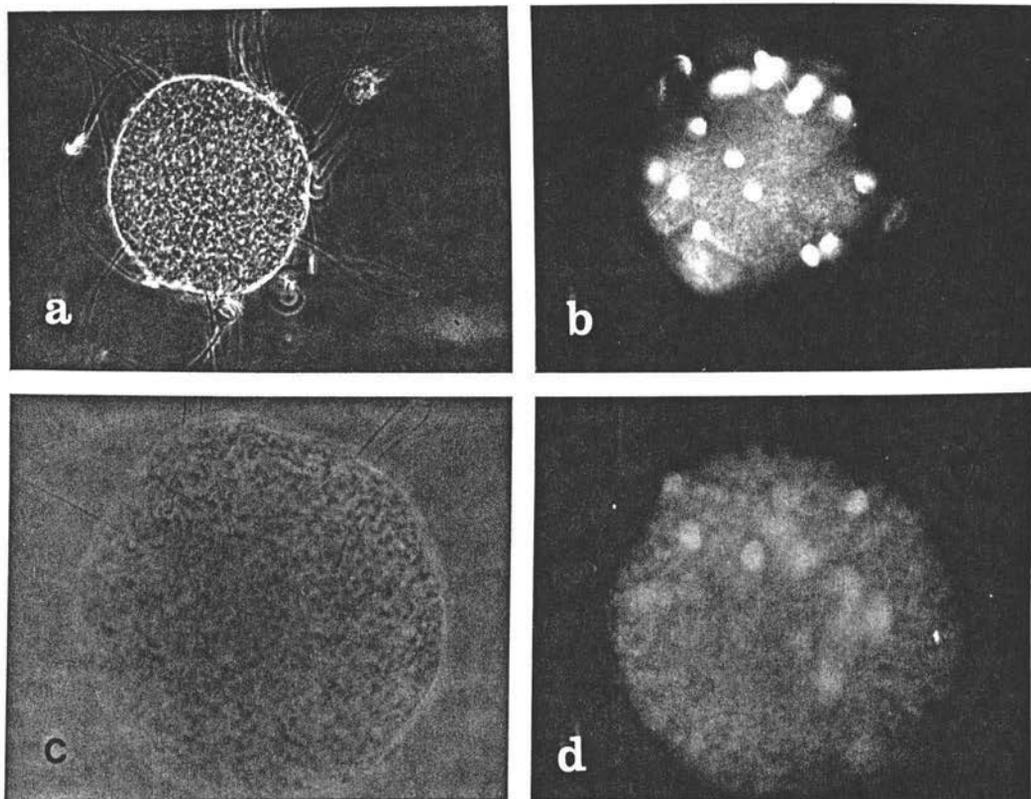


Fig. 8. Ovulos inseminados con espermatozoides con reacción acrosomal sincrónica, sin lavar y lavados para retirarles la procaína. A los espermatozoides se les indujo la reacción acrosomal sincrónica por la adición de procaína (véase Métodos) y fueron lavados o no en medio sin procaína antes de su coincubación (2 Horas) con los óvulos. a) y b) contraste de fases y tinción con Hoechst 33258 respectivamente de óvulos inseminados con espermatozoides sin lavar. c) y d) contraste de fases y fluorescencia (Hoechst) de óvulos inseminados con espermatozoides lavados. Es aparente un grado similar de polispermia y de descondensación de los núcleos espermáticos en ambos casos.

sólo 15 minutos de coincubación, los óvulos fueron lavados por transferencia a gotas sucesivas de medio de coincubación, para retirar a los espermatozoides que no se hubieran adherido fuertemente (fusionado). Para el lavado se utilizó MCM-PL-A sin calcio, lo que evitaría la presentación de la reacción acrosomal en espermatozoides que no la hubieran sufrido antes del lavado. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1. EFECTO DEL LAVADO EN MEDIO SIN CALCIO SOBRE LA ADHESION DE LOS ESPERMATOZOIDEOS AL OVULO.

Número de lavados en Medio MCM-PLA sin calcio.	Inseminación con espermatozoides:	
	Control	Procaína
	Espermatozoides/óvulo	
3	8 (9)	15 (12)
6	7 (7)	16 (15)
9	8 (10)	12 (17)
12	8 (12)	10 (9)
15	6 (13)	13 (18)

Los espermatozoides fueron incubados en el medio MCM-PL (control para tener reacción acrosomal (RA) espontánea), y en MCM-PLG, al que se le añadió procaína a los 30 minutos para inducir la RA sincrónica. La coincubación se realizó en presencia de un número similar de espermatozoides con RA en ambos grupos. Entre paréntesis se muestran los valores de un segundo experimento. El número total de óvulos trabajados fue 165 dividido entre los dos experimentos, cuatro grupos.

En los dos experimentos realizados se vió que un número ligeramente mayor de los espermatozoides tratados con procaína se adherían por óvulo, que de los espermatozoides control (el número de espermatozoides con reacción acrosomal era similar en las dos muestras). Ambos tipos de espermatozoides

presentaron una fuerte adhesión al óvulo, ya que quince lavados no fueron suficientes para retirarlos. Los flagelos fueron utilizados para el conteo de los espermatozoides. No puede aseverarse para ninguno de los dos casos, que todos los espermatozoides unidos carecieran de acrosoma.

2) Fertilización polispérmica gradual, con espermatozoides tratados con procaína desde el inicio de la incubación. Con la procaína añadida al inicio de la incubación generalmente fueron observados espermatozoides con reacción acrosomal a partir de los 20-30 minutos de iniciada la incubación, la RA fue asincrónica y con el tiempo aumento el número de espermatozoides con reacción acrosomal. Se inseminaron óvulos con espermatozoides tratados con procaína añadida al inicio de la incubación y con espermatozoides con reacción acrosomal sincrónica, por procaína añadida hasta los 30 minutos de la incubación.

Los óvulos coincubados durante dos horas con los espermatozoides que sufrieron reacción acrosomal sincrónica, mostraron una polispermia mayor que los óvulos fertilizados por 2 horas con espermatozoides tratados con procaína al inicio de la incubación (Fig.9). En estos últimos, la descondensación de los núcleos espermáticos fue más heterogénea, lo cual concuerda con una presentación gradual de la reacción acrosomal.

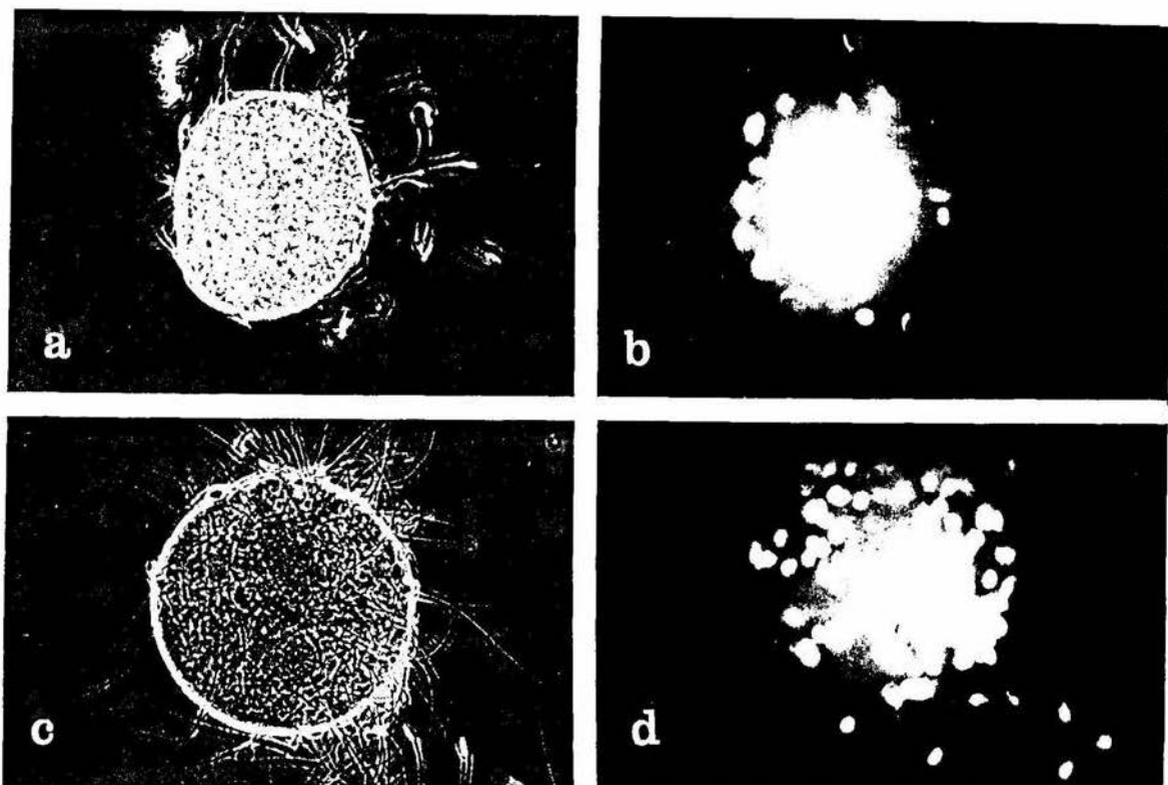


Fig. 9. Ovulos inseminados con espermatozoides tratados con procaína al inicio y a los 30 minutos de su incubación en MCM-PLG. La coincubación de los gametos se realizó en el medio Tyrode-PLGA durante 2 horas. a) y b) contraste de fases y tinción con Hoechst 33258 respectivamente de óvulos inseminados con espermatozoides tratados con procaína al inicio de su incubación. c) y d) contraste de fases y fluorescencia de óvulos inseminados con espermatozoides tratados con procaína a los 30 minutos de su incubación en el medio MCM-PLG. Se observa mayor polispermia en los óvulos fertilizados con espermatozoides con reacción acrosomal sincrónica (d), que en los óvulos coincubados con espermatozoides tratados con procaína desde el inicio de su incubación.

3) Posible arresto de reacciones acrosomales posteriores a las inducidas en los primeros 15 minutos de tratamiento con procaína.

En los espermatozoides del cobayo capacitados en el medio de Tyrode con piruvato, lactato y glucosa (Tyr-PLG), la reacción acrosomal se presenta hasta las ocho horas de iniciada la incubación (Rogers, y Yanagimachi, 1975). Con base en lo anterior, se trataron espermatozoides para producirles la reacción acrosomal de manera sincrónica. La adición del anestésico se realizó a los 30 minutos de iniciada la incubación de los espermatozoides en MCM-PLG, el anestésico se dejó actuar por 15 minutos y se tomó una muestra alícuota (10 μ l), que se transfirió al medio Tyr-PLG (300 μ l).

Tanto en los espermatozoides en MCM-PLG con procaína como en los transferidos a Tyr-PLG se valoró la pérdida de acrosoma (reacción acrosomal) en muestras fijadas en formaldehído, cada 15 minutos a lo largo de 60 minutos de incubación (Tabla 2). De manera paralela, en algunos experimentos se inseminaron óvulos, suspendidos en el medio de Tyrode-PLG con albúmina, con espermatozoides con reacción acrosomal producida de manera sincrónica. Los óvulos se fijaron a los 15 y 5 minutos de iniciada la coincubación.

En relación al arresto de la reacción acrosomal, en un primer experimento, la valoración del incremento de la reacción acrosomal, cuantificada por la pérdida

del acrosoma, mostró que el número de espermatozoides sin acrosoma permaneció casi constante desde el inicio de la transferencia, hasta los 45 minutos de haber sido transferidos al medio Tyrode-albúmina (RA = 23%, 25.% y 27% a los 15, 30 y 45 minutos de trasferidos, respectivamente). En este mismo experimento se inseminaron óvulos durante 15 minutos y por contraste de fases pudieron observarse espermatozoides con la cabeza semi-internalizada; ya que sólo fue aparente la mitad posterior de la cabeza espermática sobre la superficie del óvulo (Figura. 10). El arresto de la reacción acrosomal se valoró en otros 3 experimentos más y el resultado como puede apreciarse en la Tabla 2, fue variable de muestra a muestra.

TABLA 2. VALORACION DEL INCREMENTO DE LA REACCION ACROSOMAL EN LOS ESPERMATOZOIDEOS TRANSFERIDOS AL MEDIO DE TYRODE-PLGA

Espermatozoides	Exp.Num	Incubación (min) en el medio de transferencia o en el medio control.			
		15	30	45	60
No transferidos (control)	1	36	69	65	68
	2	87	89	92	95
	3	11	16	--	20
	4	16	15	--	--
Transferidos	1	20	25	27	41
	2	21	44	94	91
	3	20	20	26	28
	4	22	24	--	--

Los espermatozoides fueron incubados 30 minutos en el medio MCM-PLG y se les adicionó la procaína. Quince minutos después, se tomó una muestra alícuota y se diluyó 30 veces en el medio Tyrode-PLGA. Se valoró la RA, por la pérdida de acrosoma, en muestras fijadas a los tiempos indicados, tanto en la muestra transferida como en su control sin diluir. Los datos mostrados corresponden a los porcentajes de reacción acrosomal, en las cuatro muestras ensayadas.



Fig. 10. Ovulos inseminados con espermatozoides con reacción acrosomal producida por procaína. El tiempo de coincubación fue de 5 minutos. a) y b) contraste de fases y fluorescencia respectivamente. Las flechas muestran espermatozoides internalizándose en los óvulos.

Con base en los datos mostrados en la Tabla 2, se consideró necesario valorar la penetración de espermatozoides durante fertilizaciones realizadas en el medio de Tyrode-PLGA de duración muy corta, donde el incremento de reacción acrosomal podría ser nulo. Así, la interacción de los gametos se terminó a los 15 minutos y a los 5 minutos de su inicio. La fertilización que se obtuvo fue de 100%. En los 53 óvulos trabajados claramente se observaron cuando menos 1 ó 2 espermatozoides sin acrosoma por óvulo, cuya cabeza estaba penetrándolo y por lo tanto no era visible en su totalidad, uno de estos óvulos se mostró en el figura 10. Los datos cuantitativos fueron: de 53 óvulos valorados; 13 tenían de 1 a 2 espermatozoides; 22 presentaban de 3 a 4; 13 de 5 a 6, y 5 óvulos mostraron de 7 a 8 espermatozoides.

4) Fertilización con espermatozoides tratados con procaína a los 5 minutos de incubación en MCM-PLG. Y fertilización simultánea con los espermatozoides control.

A espermatozoides incubados sólo 5 minutos en MCM-PLG se les trató con procaína, que se dejó actuar 15 minutos y con ellos se inseminó un lote de óvulos. Los espermatozoides control se incubaron paralelamente en MCM-PL y simultáneamente se inseminó con ellos a otro lote de óvulos. La coincubación se realizó en el

medio de Tyrode-PLGA. En ambos lotes de ovulos hubo fertilización. El número de espermatozoides que penetraron por ovocito, fue claramente menor en los óvulos inseminados con los espermatozoides control que en los inseminados con los tratados con procaína. (Fig. 11 y Fig. 12, respectivamente).

El número promedio de espermatozoides control internalizados fue de 4 (óvulos observados, 6) mientras que en el grupo experimental el promedio fue 9 (óvulos trabajados, 6).

También fue aparente un mayor número de espermatozoides sin acrosoma, provenientes del tratamiento con procaína (Fig. 12). Además, un mayor número de espermatozoides tratados con el anestésico, se adhirieron por óvulo (compare la Fig. 11a con la Fig. 12a).

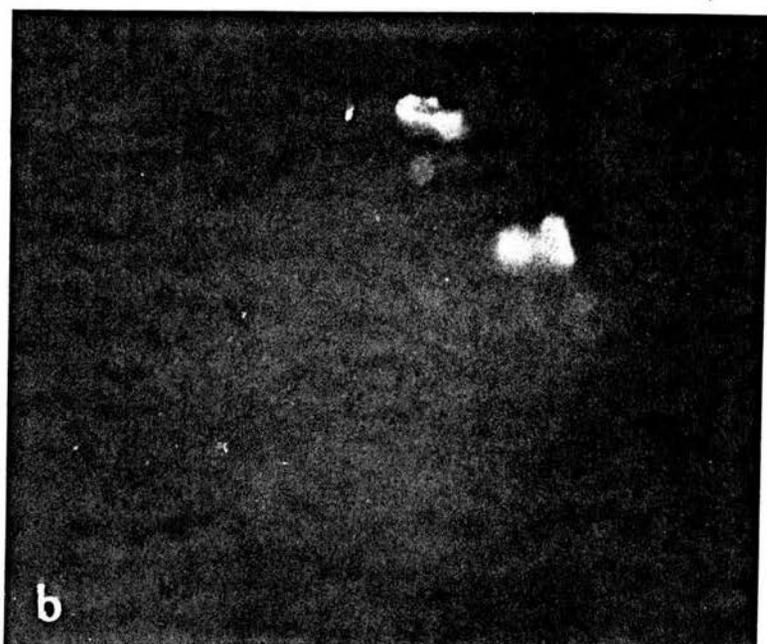
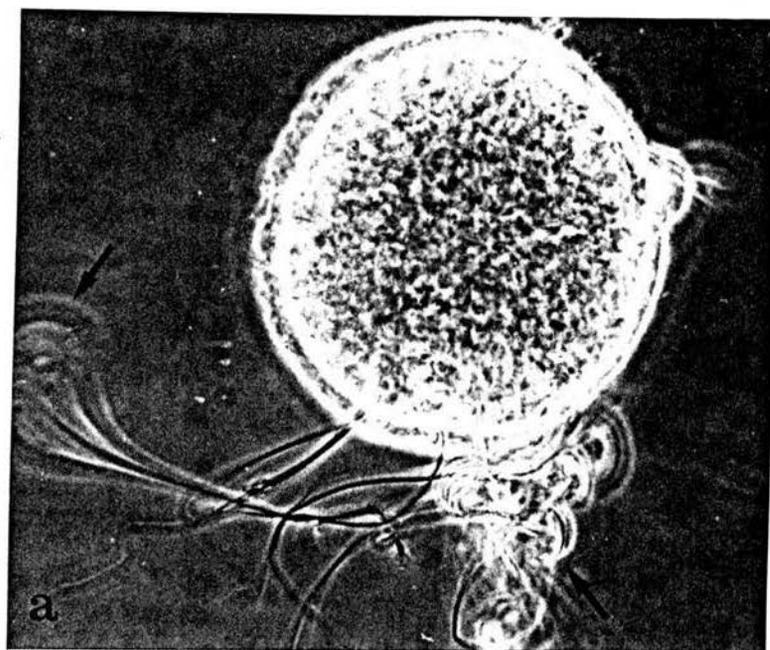


Fig.11. Ovulos inseminados con espermatozoides incubados en MCM-PL durante 20 minutos y transferidos al medio de coincubación con los óvulos, el tiempo de inseminación fue de 2 horas. a) y b) contraste de fases y fluorescencia respectivamente. En a) se observan espermatozoides en la cercanías del óvulo y se presentan con acrosoma(--), en b) se muestran pocos espermatozoides dentro del óvulo.

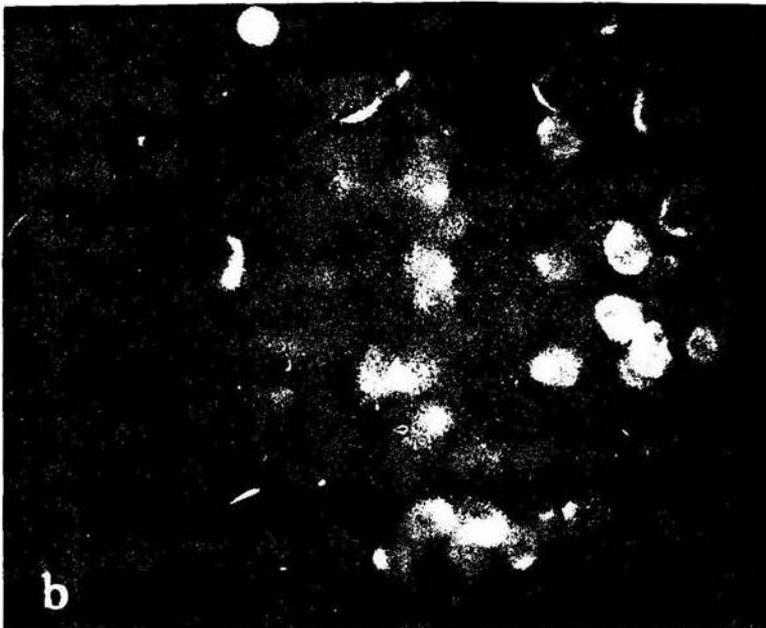
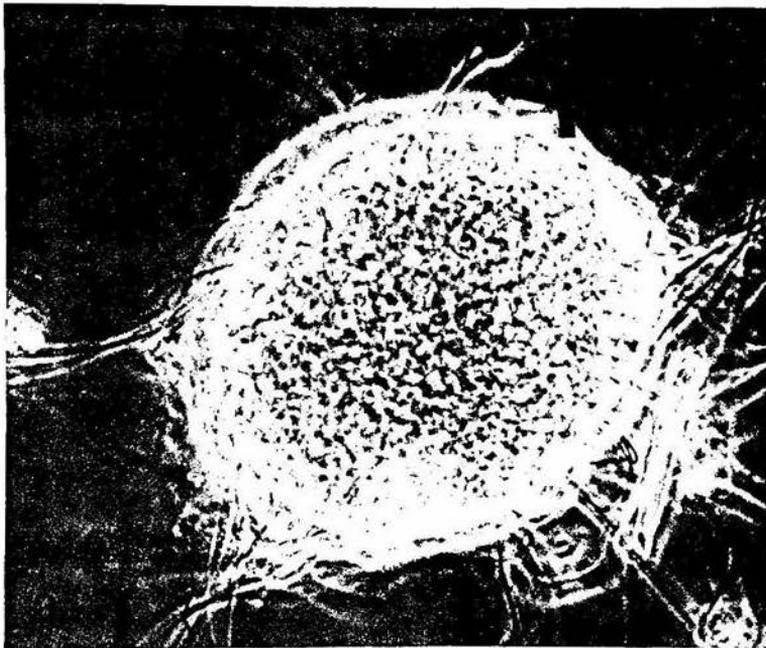


Fig.12. Ovulos inseminados con espermatozoides con reacción acrosomal inducida por procaína. Los espermatozoides fueron incubados por 5 minutos previo a la adición del anestésico, el cual se dejó actuar por 15 minutos. El tiempo de coincubación fue de 2 horas. a) y b), contraste de fases y fluorescencia respectivamente. Las flechas indican espermatozoides que han erdido su acrosoma. En b), se puede observar que existen varios espermatozoides internalizados.

D I S C U S I O N

Una variedad de anestésicos locales han sido ensayados para conocer sus efectos sobre la motilidad de espermatozoides de diferentes especies (Lindemann, Goltz y Kanous, 1987; Lindemann y col. 1990; Collins y Epel, 1977; Hong y col. 1985). En el espermatozoide del bovino, Singh y col. (1983) mostraron la expresión de motilidad hiperactivada después de la adición de dibucaína y otros anestésicos, entre ellos la procaína. En el espermatozoide del cobayo, la dibucaína produjo motilidad hiperactivada, y disminuyó el tiempo de incubación requerido para que se presente la reacción acrosomal, observandose también una captación más temprana de calcio (Singh, Babcock y Lardy, 1983).

PROCAINA

En este trabajo, el anestésico local procaína, adicionado a los espermatozoides del cobayo incubados en el medio MCM-PL más glucosa, les produjo movimiento hiperactivado, tal como ya fue descrito (Mújica y col., 1992). Bajo estas condiciones, la procaína al igual que la dibucaína aceleró la presentación de la reacción acrosomal, sólo fueron necesarios 20 ó 30 minutos de incubación. Sin procaína la reacción

acrosomal de los espermatozoides incubados en MCM-PLG se inició alrededor de los 120 minutos. Por efecto de la dibucaína, Singh y col., (1983) mostraron que la reacción acrosomal de los espermatozoides del cobayo se presentaba 30 minutos antes que en el control.

CALCIO EXOGENO

Un absoluto requerimiento de calcio exógeno fue observado, para la expresión de la reacción acrosomal inducida por procaína. Igualmente el calcio exógeno fue indispensable, para que la dibucaína produjera la reacción acrosomal (Singh y col. 1983). En general, la reacción acrosomal es absolutamente dependiente de calcio exógeno (Boitano y Omoto, 1992; Wassermann, 1987).

Los 5 minutos de incubación, que los espermatozoides requirieron para responder a la procaína con presentación de la reacción acrosomal sincrónica, podrían deberse:

- 1) A la necesidad de una concentración umbral de calcio libre intracelular. Los espermatozoides del cobayo incubados en el medio MCM-PLG, incrementan constantemente su concentración de calcio libre intracelular y la procaína añadida a los espermatozoides, les causa una elevación grande e inmediata de la concentración de calcio libre en su citoplasma (Mujica y col., en prensa). Podría considerarse que el umbral necesario de calcio libre,

para la expresión de la reacción acrosomal, se alcance con la suma del nivel basal, más el captado durante 5 minutos, más el que la procaína introduce abruptamente; mientras que, el calcio introducido por la procaína más el nivel basal, no sean suficientes aún; es decir, cuando la procaína se añade al inicio de la incubación.

ATP

2) La reacción acrosomal ha sido correlacionada con la concentración de ATP del gameto (Hyne and Edwards, 1985). En el medio de incubación empleado, MCM-PL con 5.56 mM de glucosa; la concentración de ATP basal en espermatozoides lavados en NaCl ($9.18 \text{ nm}/10^8$ células) se incrementa al doble ($21.71 \text{ nm}/10^8$ células), a partir del primer minuto de iniciada la incubación en el medio con glucosa (Mújica y col. 1991). Con base en esta observación podría sugerirse, que la concentración incrementada de ATP sea la requerida para la expresión de la reacción acrosomal y que por ello, la procaína no pudo provocar la reacción acrosomal cuando fue añadida al inicio de la incubación.

3) Podría también considerarse que en los primeros 5 minutos de la incubación ocurran cambios inherentes a la capacitación, los cambios mínimos suficientes para que el espermatozoide responda con reacción acrosomal al influjo de calcio provocado por

la procaína.

En todas las especies de mamíferos estudiadas hasta la fecha se ha demostrado más allá de cualquier duda, que la reacción acrosomal de los espermatozoides es un prerrequisito esencial para la fusión al óvulo (Barros y Berrios, 1977).

Se acepta que al momento de sufrir la reacción acrosomal, en el espermatozoide de los mamíferos ya ha ocurrido su capacitación (Eddy, 1988; Yanagimachi, 1988). La procaína podría cancelar casi en su totalidad la necesidad de capacitación y sólo requerir los cambios que ocurren en los primeros 5 minutos de incubación de los espermatozoides en un medio capacitante. Lo anterior sería similar a lo que ocurre con la reacción acrosomal, por la presencia del ionóforo de calcio A23187 en un medio con calcio (Liu, y Baker, 1990), donde no se requiere la capacitación de los espermatozoides y la reacción acrosomal se da en respuesta a la entrada de calcio causada por el ionóforo, hemos indicado que la procaína origina un incremento abrupto de la concentración de calcio libre intraespermático.

En este trabajo se empleó el modelo de fertilización heteróloga y diferentes condiciones de ensayo para aclarar la capacidad fertilizante de los espermatozoides con reacción acrosomal aparente inducida por la procaína. La tinción de los núcleos espermáticos con el reactivo de Hoechst permitió

fácilmente definir, desde las 2 horas de coincubación de los gametos, la ocurrencia de la fertilización; como previamente había sido comunicado (Labra, 1990).

La observación por microscopía de contraste de fases, de estos óvulos fijados y teñidos con Hoechst, no nos permitió fácilmente distinguir la presencia de núcleos espermáticos internalizados. Sin embargo, fue muy útil, en el aspecto de que: el observador podía distinguir al microscopio si las cabezas descansaban sobre la superficie del ovocito o una parte de ellas ya no era visible, lo que a nuestro criterio indicaba el inicio de la penetración; lo cual permitió valorar la fertilización a tiempos muy cortos de interacción de los gametos.

POLISPERMIA

Se ha indicado, que ocurre una fuerte unión (fusión temprana) entre espermatozoides con reacción acrosomal y los óvulos sin zona pelúcida, pero no con los espermatozoides que conservan su acrosoma, ya sea capacitados o no capacitados (Yanagimachi y Noda, 1970; Yanagimachi, 1978). La observación de que el lavado por transferencia a gotas sucesivas (15 veces), de los óvulos con los espermatozoides adheridos, no causaron desprendimiento de los espermatozoides (Tabla 1.) con reacción acrosomal dada por procaína sugiere, que la pérdida de su acrosoma representa una reacción acrosomal verdadera.

Los óvulos inseminados con muestras de espermatozoides control o con los tratados con procaína, presentan un porcentaje de reacción acrosomal similar; la polispermia fue siempre mayor en los fertilizados con espermatozoides tratados con el anestésico. Lo anterior podría atribuirse a un mayor envejecimiento de los espermatozoides control debido al tiempo prolongado que los espermatozoides necesitaron (90 a 180 minutos), para alcanzar el mismo grado de reacción acrosomal.

La polispermia no fue atribuible a un efecto del anestésico sobre el óvulo mismo (Ahuja, 1982), ya que los espermatozoides tratados con procaína cuando se lavaron, antes de coincubarlos con los ovocitos produjeron el mismo grado de polispermia que los espermatozoides que no fueron lavados previamente (Fig. 7).

Bajo las condiciones de fertilización, podría objetarse que los espermatozoides fertilizantes fueran los que mostraron la reacción acrosomal aparente inmediata por la adición de procaína, que más bien podrían haber sido aquellos espermatozoides que al continuar su proceso de capacitación en el medio de coincubación MCM-PLA, hubieran posteriormente sufrido la reacción acrosomal y haber penetrado a los óvulos. El problema anterior fue atacado, mediante la coincubación de los gametos en el medio de Tyrode-PLGA; un medio en el que la reacción acrosomal de los

espermatozoides del cobayo, se retarda hasta 7 horas (Yanagimachi y Usui, 1975). Sin embargo, aunque el incremento del porcentaje de reacción acrosomal fue de sólo 5% (en 3 de los 4 experimentos) en los espermatozoides tratados con procaína y transferidos al medio de Tyrode PLG-A (valorada la reacción acrosomal entre los 15 y 30 minutos de transferidos) (veáse Resultados, Tabla 2), la polispermia observada podría deberse a dicho incremento, cuando la coincubación fuera prolongada (más de 30 minutos).

Los ovocitos inseminados con muestras de espermatozoides, que presentaban un alto porcentaje de reacción acrosomal (ya fueran gametos control o tratados con procaína), presentaron siempre un alto grado de polispermia (Fig. 6). Además los núcleos espermáticos mostraban diferente grado de descondensación. Estos resultados concuerdan con lo comunicado por Yanagimachi (Yanagimachi, 1988), respecto a que no ocurre ningún bloqueo a la polispermia cuando se utilizan óvulos desnudos del hámster y que siguen entrando espermatozoides a lo largo de una incubación heteróloga.

De los datos mostrados sobre el arresto de reacciones acrosomales posteriores a las inducidas por la adición de procaína, cuando los espermatozoides se transfirieron al medio de Tyrode-PLG-A, la fertilización positiva a tiempos muy cortos de coincubación en el medio de Tyrode-PLG-A sugerimos,

que efectivamente, los óvulos fueron fertilizados por los espermatozoides con reacción acrosomal producida por la procaína.

La sugerencia anterior se apoya en el mayor grado de penetración presentado por los óvulos fertilizados con espermatozoides con reacción acrosomal inducida por procaína a los 5 minutos de incubación, en comparación con la polispermia dada por los espermatozoides sin procaína, cuando ambos, fueron transferidos simultáneamente al medio de coincubación con los óvulos. Consideramos, que en ambas muestras la reacción acrosomal se debería producir en el mismo grado, durante la coincubación con los ovulos y que la diferencia en el mayor grado de polispermia podría atribuirse a los espermatozoides con RA dada por la procaína.

CONCLUSIONES

1.- La representación de la reacción acrosomal producida por la procaína es dependiente del tiempo de incubación de las muestras previo a la adición del anestésico y el porcentaje de RA es variable de muestra a muestra.

2.- La procaína añadida desde el inicio de la incubación adelanta la presentación de la reacción acrosomal, cuando menos en una hora 30 minutos.

3.- La reacción acrosomal en espermatozoides adicionales, de muestras tratadas con procaína, en algunos casos es arrestada (hasta 30 minutos) si los espermatozoides tratados con el anestésico se transfieren al medio de Tyrode (Tyrode-PLGA).

4.- Existe un mayor grado de polispermia en los óvulos inseminados con espermatozoides con reacción acrosomal sincrónica, que aquellos inseminados con espermatozoides con reacción acrosomal espontánea. Así como con los cincubados en MCM-PL durante el mismo tiempo, que duró el tratamiento con procaína, en MCM-

PLG y procaína añadida al inicio de la incubación.

5.- La polispermia observada es atribuible a la acción de la procaína en el espermatozoide y no a su acción sobre el óvulo mismo.

6.- Los espermatozoides con aparente reacción acrosomal producida por procaína tienen una RA verdadera, ya que fueron capaces de fertilizar a óvulos de hámster carentes de zona. La conclusión anterior se basa primordialmente en los siguientes resultados. 1) La polispermia no fue atribuible a un efecto de la procaína sobre el óvulo. 2) Siempre existió una correlación positiva entre el grado de polispermia después de la inseminación con espermatozoides tratados con procaína y el número de espermatozoides con RA. 3) Bajo condiciones idénticas de coincubación, y sin retraso en la inseminación; los espermatozoides tratados con procaína a los 5 minutos de incubación ocasionaron mayor grado de polispermia, que su control. La mayor polispermia no es atribuible a la RA espontánea.

7.- Mediante el uso de este sistema, es posible efectuar inseminaciones con gametos no envejecidos, y obtener elevados índices de fertilización, a tiempos muy cortos de coincubación.

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

1.- Ahuja, K. K. (1982) In vitro inhibition of to block to polyspermy of hamster eggs by tertiary amine local anaesthetics. *J; Reprod. Fert.* 65: 15-22.

2.- Austin, C. R. (1952) The " Capacitation of the mammalian sperm". *Nature.* 170: 326.

3.- Barros, C. y Yanagimachi, R. (1971) Induction of the zone reaction in golden hamster eggs by cortical granule material. 233: 268-269.

4.- Bedford, J. M. y Cooper, G. W. (1978) Membrane fusion events in the fertilization of vertebrate eggs. *Cell Surf. Rev.* 5: 65-125.

5.- Bedford, J. M., Moore, H. D. M. y Franklin, L. E. (1979) Significance of the ecuatorial segment of the acrosome of the spermatozoon in eutherian mammals. *Exp. Cell. Res.* 119: 119-126.

6.- Boitano, S. y Omoto, Ch. K.,. (1992) Trout Sperm Swimming Patterns and role of intracellular Ca Cell. Motil. and Cytoskeleton. 21: 74-82.

7.-Breitbart, H., Rubistein, S. y Nass-Arden, L. (1985) The Role of Calcium and Ca-ATPase in Maintaining Motility in Ram Spermatozoa. *J. Biol. Chem.* 260. 21: 11548-11553.

8.- Burks, J. D y Salino, M. P. (1992) Molecular mechanism of fertilization and activation of development. *Annual Reprod. Sci.* 28: 79-86.

9.- Chang, M. C. (1951) Fertilizing capacity of spermatozoa deposited in fallopian tubes. *Nature*. 168: 997-998.

10.-Chang, M. C. (1978) The Meaning of Sperm Capacitation. A historial Perspective. *J. Androl.* 5: 45-50.

11.-Collins, F. y Epel, D. (1977) The Role Calcium ions in the Acrosome Reaction of Sea Urchin Sperm. *Exp. Cell. Res.* 106. 211-222.

12.- Coronel, C. E. y Lardy, H. A. (1987) Characterization of Ca uptake by guinea pig epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod.* 37: 1097-1107.

13.- Critser, E. S. y First, N. L. (1986) Use of fluorescent stain for visualization of nuclear material in living oocytes and early embryos. *Stain Technology.* 61. 1: 1-5.

14.- Dekel, N. (1988) Regulation of Oocyte Maturation by Cell to Cell Communication. *Cell to Cell Communication in Endocrinology. Serono Symposia Publication.* Raven Press. 49: 181-194.

15.- Eddy, E. M. (1988) The Spermatozoon. In: *The Physiology of Reproduction.* Eds. Knobil and Neill. Raven Press Ltd. New York. 27-68.

16.- Epel, D. (1990) The Iniciation of development at fertilization. *Cell Differentiation and Development.* 29: 1-12.

17.-Feng, B., Bhattacharyya, A. y Yanagimachi, R. (1988) Ca is Essential for the Motility of PLasma Membrane-Intact, but not of demembrated, hamster Spermatozoa. *Andrologia*. 20.1: 155-162.

18.- Fleming, A. D. y Yanagimachi, R. (1980) Superovulation and superpregnancy in the golden hamster. *Develop. Growth and Differ.* 22. 2: 103-112.

19.- Hong, C.Y., Chiang, B. N., Ku, J., Wei, H. Y. y Fong, J. C. (1985) Calcium antagonist stimulate sperm motility in ejaculated human semen. *BR. J. Clin. Pharmac.* 19: 45-49.

20.- Huang, T. T. F., Kosower, N. S. y Yanagimachi, R. (1984) Localization of Thiol and Disulfide groups in Guinea-pig Spermatozoa During Maturation and Capacitation Using Bimane Fluorescent Labels. *Biol. Reprod.* 31: 797-809-

21.- Huang, T. T. F. y Yanagimachi, R. (1985) Inner acrosome membrane of mammalian spermatozoa : Its properties and possible functions in fertilization. *Am. J. Anat.* 174: 249-268.

22.- Hyne, R. V. y Edwards, K.D. (1985) Influence of 2-deoxy-D-glucose and energy substrates on guinea pig sperm capacitation and acrosome reaction. *J. Reprod. Fertil.* 73: 59-69.

23.- Kline, D. (1991) activation of the egg by the sperm. Development begins with production of messenger molecules of the egg cell. *Bioscience.* 41.2: 89-95.

24.- Labra, B. M. (1990) Localización de la Calmodulina en los gametos masculino y femenino durante su interacción en la fertilización heteróloga. Tesis. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala. UNAM.

25.- Lindeman, C. B., Goltz, J. S. y Kanous, K. S. (1987) Regulation of Activation State and Flagellar Wave Form in epididymal Rat Sperm: Evidence for the Involvement of Both Ca and cAMP. Cell Motility and the Cytoskeleton. 8: 324-332-

26.- Liu, D. Y. y Baker, W. G. (1990) Inducing the human acrosome reaction with a calcium ionophore A23187 decreases sperm-zona pellucida binding with oocytes that failed to fertilize in vitro. J. Reprod. Feril. 89: 127-134.

27.- Mack, S., Bhattacharyya, A. K. Joyce, C. , Vandervan y Zaneveld, L. J. D. (1983) Acrosomal Enzymes of Human spermatozoa Before and After In Vitro Capacitation. Biol. Reprod. 28: 1032-1042.

28.- Mohri, H., Minori, A y Ishijima, S. (1989) Maturation and Capacitation of Mamalian Spermatozoa. Development of Preimplantation Embryos and their Environment. 53-62.

29.- Mori, C., Hashimoto, H. y Hoshino, K. (1988) Fluorescence Microscopy of nuclear DNA in oocytes and Zygotes During in Vitro Fertilization and Development of Early Embryos in Mice. Biol. Reprod. 39: 737-742.

30.-Mújica, A., Moreno-Rodriguez, R., Naciff, J., Neri, L. y Tash, J. S. (1991) Glucose Regulation of Guinea-pig sperm motility. *J. Reprod. Fert.* 92Ñ 75-87.

31.- Mújica, A., Neri-Bazan, L., Tash, J. S. y Uribe, S. (1993). Mechanism for Procaine-Mediated hyperactivated Motility in Guinea pig Spermatozoa. *Mol.Reprod. Develop.* en prensa.

32.-Ono, K., Yanagimachi, R. y Huang, Jr. T. F. (1982) Phospholipase A of Guinea pig Spermatozoa: Its Preliminary Characterization and Possible Involvement in the Acrosome Reaction. *Develop. Growth and Differ.* 24. 4: 305-310-

33.- Orgebin Crist, D.W. (1986) Maturation of hamster spermatozoa epididymal. *Biol. Reprod.* 87-91.

34.- Perreault, S. D., Barbee, R. R., Elstein, K. H., Zucrer, R. M. y Krefer, C. L. (1988) Interspecies Differences in the Stability of Mammalian Sperm Nuclei assesed in Vivo by Sperm Microinjection and in Vitro by flow Cytometry. *Biol. Reprod.* 39: 157-167.

35.- Placjot, M., Mandelbaum, J. y Juca, Anne-Marie (1984) Acrosome reaction of hman sperm used for in vitro fertilization. *Fertil. Steril-* 42. 3: 418-423.

36.- Rogers, B. J. (1978) Mammalian Sperm Capacitation and Fertilization In Vitro: A Critique of Methodology. *Gamete Res.* 1: 165-223.

37.- Rogers, B. J. (1983) Hamster egg: Evaluation of human sperm using In vitro Fertilization. In: In vitro fertilization and Embryo Transfer. Academic Press London. 23-45.

38.- Sawicki, W. y Mystkowska, E. T. (1990) In Vivo Staining of Mouse Preimplantation Embryos with Hoechst 33342. Anat. Rec. 227: 359-362.

39.-Singh, J. P., Bacock, D. F. y Lardy, H. A. (1983) Motility Activation, Respiration Stimulation and Alteration of Ca Transport in Bovine Sperm Treated with Amine Local Anesthetics and Calcium Transport antagonist. Arch.of Biochem. Biophysics. 221: 291-303.

40.- Stewart-Savage, J. y Bavister, B.D. (1988) A Cell Surface Block to polysperm Occurs in Golden Hamster Eggs. Develop. Biol. 128: 150-157.

41.- Suarez, S. S., Katz, D. F., Owen, D. H., Andrew, J. B. y Powel, R. L. (1991) Evidence for the Function of Hiperactivaded Motility in Sperm. Biol. Reprod. 44: 375-381.

42.- Talbot, P. (1984) Hyaluronidase Dissolves a Component in the Hamster Zone Pellucida ,J. Exp. Zool. 229: 309-316.

43.- Wassarman, P. M. (1987) The Biology and Chemistry of Fertilization. Science 235: 553.

44.- Wassarman, P. M. (1987) Early Events in Mammalian Fertilization. Ann. Rev. Cell. Biol. 3: 109-142.

45.- Wassarman, P. M. (1988) *The Mammalian Ovum*. In: *The Physiology of Reproduction*. Eds. Knobil, E. and Neill. Raven Press Ltd. New York. 69-102.

46.- Wenzl, A. C., Repp, J. E., Marxson, W. S., Pittaway, D. E. y Torbit, C. A. (1983) *The Problem of Polispermy in vitro fertilization*. *Fertil. Steril.* 40. 6: 748-754.

47.- Yanagimachi, R. y Noda, Y. D. (1970) *Ultrastructural changes in the hamster sperm head during fertilization*. *J. Ultrastruct. Res.* 31: 465-485.

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

49.- Yanagimachi, R. (1981) *Mechanisms of Fertilization in Mammals*. In: *Fertilization and Embryonic Development In Vitro*. Eds. Mastroianni, L. and Biggers, J. D. 81-182. Plenum Press, New York.

50.- Yanagimachi, R. (1984) *Zona-free Hamster eggs: Their use in assessing fertilizing capacity and examining chromosomes of human spermatozoa*. *Gamete. Res.* 10: 187-232.

51.- Yanagimachi, R. (1988) *Mammalian fertilization*. In: *the Physiology of Reproduction*. Eds. Knobil, E. and Neill. Raven Press. Ltd. New York. 135-185.