

00346

1
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO DE LOS FACTORES DEL PLASMA SEMINAL
QUE CAUSAN INHIBICION DE LA CAPACITACION
ESPERMATICA EN CERDO

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
P R E S E N T A :

EDMUNDO BONILLA GONZALEZ



MEXICO, D. F.

MAYO DE 1995



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 está 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.

**Esta tesis se realizó en el laboratorio de Biología Celular,
Departamento de Ciencias de la Salud,
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa,
con la Dirección del Dr. Miguel Betancourt Rule.**

ESTE TRABAJO FUE PARCIALMENTE FINANCIADO

POR CONACyT

(Clave 1505-M9207)

DEDICATORIA

A mis padres: Luz María González y Edmundo Bonilla
Su "dasita" los adora.

A Laura Hernández,
con mucho amor.

A May, Marco, Gary, Hernán y Elsa,
por la alegría y el orgullo de ser su hermano.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Miguel Betancourt Rule, por su amistad, apoyo y guía para la realización del presente estudio.

A mis compañeros del laboratorio de biología celular, por hacer que el trabajo en la universidad sea, además de interesante, agradable.

Al Maestro Ernesto Rodríguez. Siempre te agradeceré el haberme invitado a formar parte de la UAMI.

A los Doctores Mario Altamirano, Manuel González, Concepción Gutiérrez, Omar Hernández, Isabel Melendro, y Adela Mujica, por su amable ayuda en la revisión de la tesis y sus valiosas sugerencias.

A la Granja experimental porcina Zapotitlán, de la FMVZ de la UNAM, por proporcionarnos el material biológico indispensable para este trabajo.

"De vez en cuando, la vida nos besa en la boca
y a colores se despliega, como un atlas;
nos pasea por las calles en volandas
y nos sentimos en buenas manos.

Se hace de nuestra medida, coge nuestro paso
y saca un conejo de la vieja chistera;
y uno es feliz, como el niño cuando sale de la escuela.

De vez en cuando, la vida toma conmigo café
y está tan bonita, que da gusto verla;
se suelta el pelo, y me invita a salir con ella a escena.

De vez en cuando, la vida se nos brinda en cueros
y nos regala un sueño tan escurridizo,
que hay que andarlo de puntitas, para no romper el hechizo.

De vez en cuando, la vida afina con el pincel,
se nos eriza la piel y faltan palabras para nombrar lo que ofrece,
a los que saber usarla.

Y de vez en cuando, la vida nos gasta una broma
y nos despertamos sin saber qué pasa,
chupando un palo, sentados sobre una calabaza."

J. M. Serrat

RESUMEN

En el plasma seminal de algunas especies se han reportado factores, principalmente de tipo glucoprotéico, que mantienen a los espermatozoides incapaces de fertilizar, y que por tanto han sido llamados "factores descapacitantes". El campo de estudio de estos factores se ha vuelto amplio dado que, al parecer, existe más de un factor descapacitante por especie.

En el caso del cerdo, modelo animal utilizado en el laboratorio de biología celular de la UAM-I para estudiar la fertilización en mamíferos, la participación de este tipo de factores no ha sido reportada. Es por ésto que el objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia, y realizar una caracterización inicial de los factores del plasma seminal porcino, en particular de aquellos que mantienen a los espermatozoides infértiles a causa de un impedimento para realizar la reacción acrosomal.

Los espermatozoides se lavaron por centrifugación para retirar el plasma seminal, y se incubaron en el medio de capacitación TALP durante 4 h. a 37°C. El plasma seminal fue centrifugado, filtrado a través de membranas de 0.22 μm , y mantenido en congelación mientras los espermatozoides fueron capacitados. Al término de 4 h. de capacitación, se adicionó el plasma seminal a los espermatozoides, y se incubó durante 45 min. adicionales.

El porcentaje de espermatozoides capacitados al inicio y final del periodo de capacitación, así como después de 45 min de incubación con plasma seminal, se evaluó agregando zona pelúcida solubilizada para inducir la reacción acrosomal, con la premisa de que sólo los espermatozoides capacitados pueden llevar a cabo dicha reacción.

El estado del acrosoma de los espermatozoides se evaluó mediante tinción con una lectina conjugada a fluoresceína, en un microscopio de epifluorescencia.

Los resultados de este ensayo mostraron que la adición de plasma seminal a espermatozoides capacitados, causa un impedimento para que éstos desarrollen la reacción acrosomal, equivalente al que muestran los espermatozoides antes de ser capacitados, indicando la presencia de factores descapacitantes.

Para determinar el peso molecular aproximado de los factores, se efectuó un fraccionamiento del plasma seminal mediante membranas de exclusión molecular de 10, 30, 50, y 100 kDa, y se evaluó el poder descapacitante de cada una de las cinco fracciones obtenidas. En este caso, sólo se observó efecto descapacitante con la fracción del plasma seminal con peso molecular superior a los 100 kDa, y el efecto fue dosis-dependiente.

En el presente estudio también se determinó que el factor descapacitante del plasma seminal del cerdo es de naturaleza protéica, dado que su tratamiento con tripsina anula su efecto descapacitante.

Se concluye que en el plasma seminal del cerdo existen factores descapacitantes que causan inhibición de la reacción acrosomal espermática, con peso molecular superior a los 100 kDa, y de naturaleza protéica.

INTRODUCCIÓN

FERTILIZACIÓN.

En el proceso de la fertilización, los gametos femenino (ovocito) y masculino (espermatozoide) se ponen en contacto y sus núcleos haploides se fusionan para restaurar el número cromosómico característico de la especie, y dar origen al desarrollo de un nuevo organismo (Longo, 1985).

El primer evento en la fertilización en mamíferos es la unión del espermatozoide a la estructura glucoprotéica que rodea al ovocito, denominada zona pelúcida. La unión es mediada de una manera especie-específica por receptores a espermatozoides presentes en esta estructura, que son los responsables de evitar que los espermatozoides de una especie fertilicen a los óvulos de otra (Yanagimachi, 1994), lo que se comprueba al presentarse la fertilización entre diferentes especies cuando se remueve la zona pelúcida, y por tanto se elimina al receptor de los espermatozoides. En el ratón, el receptor al espermatozoide en la zona pelúcida ha sido plenamente identificado y caracterizado. Se trata de una glucoproteína con peso molecular de 83 kDa denominada ZP3, que cuando se purifica y añade a los espermatozoides, inhibe la unión de éstos a los ovocitos. Además, la ZP3 purificada se une exclusivamente a la región acrosomal de la membrana plasmática de espermatozoides con el acrosoma intacto, e induce el desarrollo de la reacción acrosomal (Wassarman, 1992).

Después de la unión del espermatozoide a la zona pelúcida, ocurre la reacción acrosomal, en la que ciertos componentes de dicha zona interactúan con la membrana plasmática del espermatozoide, causando su fusión con la membrana acrosomal

externa que se encuentra por debajo de ella, lo cual provoca la vesiculación de la membrana plasmática y su desaparición, con la concomitante liberación de enzimas como la acrosina, y algunas proteasas, las cuales permiten que el espermatozoide se abra paso a través de la zona pelúcida, y alcance la membrana del ovocito (Peterson y cols., 1992).

A continuación ocurre la fusión de la membrana del ovocito con la membrana acrosomal interna del espermatozoide, con lo que el núcleo del espermatozoide penetra en el citoplasma del ovocito. En este momento se desarrolla un mecanismo de protección a la entrada de más de un espermatozoide a través de la llamada reacción cortical (Kline y Savage, 1994). Esta se inicia con la fusión de la membrana de los gránulos corticales con la membrana citoplásmica del ovulo; los gránulos vierten su contenido de proteasas en el espacio perivitelino, causando la alteración de algunas glucoproteínas de la zona pelúcida e incrementando su resistencia al ataque químico, idea que ha sido apoyada por Hedrick y cols. (1987), y por Shabanowitz y O' Rand (1988), al observar cambios en la composición bioquímica de la zona pelúcida porcina y humana, respectivamente, después de realizarse la fertilización.

Finalmente, ocurre la fusión de los núcleos o singamia, y la activación del metabolismo del óvulo para dar comienzo a la división celular y el desarrollo del embrión.

MADURACION ESPERMÁTICA

Después de su formación en el testículo, los espermatozoides entran al epidídimo donde sufren cambios fisiológicos, morfológicos, y bioquímicos importantes que los preparan para el proceso de la fertilización, denominados

"maduración". El tránsito de los espermatozoides en este órgano es de aproximadamente dos semanas, aunque la duración exacta varía dependiendo de la especie.

Los fluidos recuperados de cada región del epidídimo (cabeza, cuerpo, y cola) muestran diferencias importantes en cuanto a su composición bioquímica, por lo que los espermatozoides están sujetos a ambientes cambiantes a lo largo de su tránsito por el epidídimo (Parks y Hough, 1993). En los últimos años, se ha estudiado con especial interés la importancia de las proteínas secretadas por este órgano en la fertilización (Cooper, 1990).

Los efectos de las proteínas del epidídimo en la movilidad espermática ha sido demostrada en hámster, donde se ha identificado a la proteína C5, secretada por las células epiteliales de la cola del epidídimo, que al adsorberse a los espermatozoides poco móviles que llegan aquí, causa un cambio en el patrón de su movimiento hacia una movilidad progresiva (Moore y cols., 1985). Así mismo, en la rata, se ha sugerido la participación de las proteínas denominadas "D", y "E" en la movilidad espermática (Pholpramool y cols., 1983).

También se ha demostrado que algunas proteínas epididimarias tienen un efecto en la unión de los espermatozoides a la zona pelúcida. En el cerdo, los espermatozoides de la cabeza, a diferencia de los de las regiones del cuerpo y los de la cola, no pueden unirse a la zona pelúcida (Peterson y cols., 1984). Se han aislado tres proteínas de la cabeza epididimaria, con pesos moleculares de 30, 45, y 70 kDa, que al unirse a espermatozoides maduros, bloquean su unión a la zona pelúcida *in vitro* (Peterson y Hunt, 1989). En esta especie, además, se han descrito las "espermadhesinas", proteínas con afinidad a proteínas del espermatozoide y de la zona

pelúcida, que pueden participar en la unión entre los gametos masculino y femenino (Peterson y cols., 1992).

Durante la maduración epididimaria también han sido reportados cambios a nivel de membrana plasmática, entre los que se encuentran modificaciones en la composición lipídica (Susuki, 1988), en la distribución de proteínas intramembranales; Bains y cols., 1993), y en los niveles de glucosilación (Tulsiani y cols., 1993). Sin embargo, aún se desconoce cuáles de estas modificaciones están relacionadas con la adquisición de la función fertilizante de los espermatozoides. De la misma manera, los mecanismos que inducen estas alteraciones a nivel de superficie del espermatozoide, no han sido elucidados

CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA

Los espermatozoides de varios grupos de mamíferos no pueden fertilizar a los ovocitos inmediatamente después de ser eyaculados, sino que adquieren esta capacidad sólo después de permanecer cierto tiempo en el tracto reproductor femenino (Austin, 1951; Chang, 1951). Los cambios morfológicos y bioquímicos que hacen a los espermatozoides capaces de desarrollar la reacción acrosomal y fertilizar, son llamados colectivamente "capacitación".

La capacitación normalmente ocurre en el tracto reproductor femenino, lo que dificulta su estudio in vivo. Afortunadamente, se han desarrollado una gran cantidad de medios de cultivo celulares que permiten la capacitación de espermatozoides in vitro. Ningún medio sirve para todas las especies, pero la mayoría de éstos se preparan con diferentes cationes (Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2}), aniones (Cl^- , HCO_3^- , PO_4^{-2}), sustratos que aportan energía (lactato, piruvato) y, comúnmente, con

albúmina sérica de bovino (BSA) (Bonilla y cols., 1994). Los componentes anteriores se encuentran normalmente en el fluido del oviducto y actúan en conjunto, ya que ninguno de éstos en forma aislada tiene un efecto capacitante (Katz y cols., 1989).

Durante la capacitación, los espermatozoides adquieren la habilidad de 1) desarrollar una movilidad vigorosa ("hiperactivación"), 2) de liberar sus contenidos acrosomales por exocitosis (reacción acrosomal), y finalmente, 3) de fusionarse con la membrana citoplásmica del ovocito y de fertilizarlo (Yanagimachi, 1994).

Con el desarrollo de la capacitación y de la fertilización *in vitro*, se han logrado avances importantes en la comprensión de este proceso, que se mencionan a continuación.

Participación de calcio.

Se ha determinado que los iones de calcio libre juegan un papel central tanto en la movilidad hiperactiva que adquieren los espermatozoides capacitados, como en el desarrollo de la reacción acrosomal. En todas las especies de mamíferos estudiadas (ratón, humano, hámster, cerdo) se requiere calcio extracelular en concentraciones milimolares durante la capacitación para adquirir una movilidad hiperactiva y para llevar a cabo la reacción acrosomal (Yanagimachi, 1982; Thomas y Meizel, 1988; Sidhu y Guraya, 1993; Fraser, 1993).

Roldán y Harrison (1989), con base en estudios con espermatozoides de carnero, plantearon que el incremento de calcio libre citosólico en el espermatozoide después de su unión a la zona pelúcida, activa a las fosfolipasas-C específicas para polifosfoinosítidos (denominadas fosfoinositidasas-C) presentes en la membrana

citoplásmica del espermatozoide, las cuales metabolizan a los polifosfoinosítidos hasta diacilglicerol e inositol fosfato. El diacilglicerol generado de esta manera activa a la fosfolipasa-A2 (y quizá, a la proteína-cinasa C) que metaboliza fosfolípidos a lisofosfolípidos y ácidos grasos libres (entre éstos, ácido araquidónico), que pueden causar la fusión de la membrana citoplásmica del espermatozoide, con la membrana del acrosoma, originando la reacción acrosomal.

Participación de colesterol.

Se ha demostrado que el colesterol limita la inserción de proteínas en las bicapas de fosfolípidos, restringe la movilidad lateral de las proteínas membranales, y modula la actividad de algunas de ellas cambiando su conformación (Yeagle, 1989). En varias especies de animales, durante la capacitación espermática, disminuye la concentración de colesterol en la región de la membrana plasmática del espermatozoide que recubre al acrosoma (Tesarik y Flechon, 1986; Benoff y cols., 1993). La albúmina sérica presente en los fluidos del tracto reproductor femenino sirve como aceptor de esteroides, promoviendo la remoción de colesterol de la membrana plasmática del espermatozoide (Langlais y cols., 1988). Además, se ha determinado que la adición de colesterol causa una descapacitación reversible de los espermatozoides de ratón, cuyo, toro y del ser humano (Eherenwald y cols., 1988), lo cual apoya la idea de que la reducción de colesterol en la membrana citoplásmica del espermatozoide es un paso importante en la capacitación espermática.

Participación de AMPc.

Los nucleótidos cíclicos, particularmente el AMPc, son también importantes para la capacitación. La adición de nucleótidos cíclicos puede acelerar el desarrollo de la

reacción acrosomal, la movilidad hiperactiva y la capacidad fertilizante (Fraser y Ahuja, 1988). Además, la concentración intracelular de AMPc aumenta durante la capacitación, lo cual refleja cambios en la actividad de la adenilato ciclasa y de la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos, las enzimas responsables de la biosíntesis de AMPc a partir de ATP, y del rompimiento metabólico de AMPc hacia 5'AMP, respectivamente. Las mediciones en la actividad enzimática en espermatozoides capacitados *in vitro* han mostrado que existe un incremento significativo en la actividad de la adenilato ciclasa, y un descenso en la actividad de la fosfodiesterasa (Stein y Fraser, 1984).

La principal acción del AMPc es la estimulación de las proteín-quinasas dependientes de AMPc (proteín-quinasas A). De Jongue y cols. (1991) encontraron que un inhibidor de la proteín-quinasa A previene el desarrollo de la reacción acrosomal en espermatozoides capacitados de seres humanos, lo cual apoya la participación de esta enzima en la capacitación espermática.

Participación de "Factores Descapacitantes".

Chang, en 1957, observó que la adición de plasma seminal a espermatozoides de conejo capacitados causaba una inhibición de la fertilización. Si después se eliminaba el plasma seminal, los espermatozoides adquirían nuevamente su poder fertilizante, es decir, el proceso era reversible. Posteriormente, Bedford (1967) pudo remover por medio de ultracentrifugación de plasma seminal de conejo al "factor descapacitante". Estos trabajos son la base del concepto de que la capacitación se encuentra asociada a la remoción de macromoléculas (factores descapacitantes) de la superficie del espermatozoide eyaculado (Fraser y cols., 1990). Estos factores se producen en el epidídimo, y su importancia fisiológica es la de evitar que los

espermatozoides desarrollen la reacción acrosomal prematuramente, durante su estancia en este órgano, que es de aproximadamente dos semanas.

A la fecha, se han aislado y caracterizado factores descapacitantes en algunas especies de mamíferos: Eng y Oliphant (1978) reportaron un factor estabilizante del acrosoma (ASF) que se origina en el epidídimo de conejo, el cual, como su nombre lo indica, bloquea la fertilización al evitar que los espermatozoides puedan desarrollar la reacción acrosomal; Reddy y cols. (1979) encontraron un "factor antifertilidad" en plasma seminal humano, cuyo mecanismo de acción se desconoce; Fraser y cols. (1990) caracterizaron un factor descapacitante con un peso molecular de 40 kDa originado en el epidídimo de ratón que al parecer impide la penetración del espermatozoide por un bloqueo en la reacción acrosomal.

El campo de estudio de los factores descapacitantes se ha vuelto amplio dado que, probablemente, existe más de un factor descapacitante por especie (Han y cols., 1990). En el caso del cerdo, la existencia de factores descapacitantes del plasma seminal, en particular de aquellos que mantienen a los espermatozoides con bajo poder fertilizante, a causa de un impedimento para realizar la reacción acrosomal (factores estabilizantes del acrosoma), no ha sido investigada.

Dada la importancia de los factores descapacitantes en la capacitación y el poder fertilizante de espermatozoides de mamíferos, el objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia y realizar una caracterización inicial de estos factores en el cerdo, modelo animal que ha sido utilizado en el laboratorio de Biología Celular de la UAM-Iztapalapa, donde la fertilización *in vitro* se ha implementado para estudiar diversos aspectos de la fertilización en mamíferos (Fierro y cols., 1991; Betancourt y cols., 1993; Fierro y cols., 1994).

OBJETIVO

Determinar si en el plasma seminal del cerdo existen factores estabilizantes del acrosoma y, en su caso, realizar una caracterización inicial de éstos.

HIPOTESIS

Dada la importancia de los factores estabilizantes del acrosoma para el proceso de la fertilización, se plantea que en el plasma seminal del cerdo debe estar presente uno o varios de ellos.

METODOLOGÍA

OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE SEMEN

La fracción rica del eyaculado fue obtenida en bolsas de polietileno, utilizando el método de la mano enguantada, por la M.V.Z. Claudia García Hernández, en la granja de cerdos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. La muestra de semen se transportó al laboratorio a 20° C. La concentración de espermatozoides fluctuó entre 250 y 400 millones/ml, y el volumen del eyaculado entre 100 y 200 ml. En todos los casos, la movilidad de los espermatozoides al momento del eyaculado fue aproximadamente del 80%. Las razas de cerdos utilizadas en este estudio fueron York, Duroc, Hampshire y Landrace. Los experimentos se llevaron a cabo por duplicado o por triplicado en diferentes días.

CAPACITACIÓN

Trescientos millones de espermatozoides se centrifugaron en un tubo de policarbonato a 800 g durante 5 min. Se retiró el plasma seminal (sobrenadante), se agregaron 5 ml de medio de capacitación TALP (NaCl 100 mM, NaHPO₄ 0.29 mM, CaCl₂ 2.1 mM, MgCl₂ 1.5 mM, NaHCO₃ 25 mM, HEPES 10 mM, Lactato de sodio 21.6 mM, piruvato de sodio 100 µM, albúmina sérica bovina 6 mg/ml, pH 7.3, osmolaridad de 295 mOsm/kg), y se realizó una segunda centrifugación, a la misma velocidad, y durante el mismo tiempo. Se retiró el sobrenadante, los espermatozoides se resuspendieron en un ml. de medio TALP, y fueron incubados en cajas de plástico con cuatro pozos, cada uno con un ml. de capacidad, a una concentración de 30 millones/ml durante 4 horas a 37 ° C, en una atmósfera con 5% de CO₂, en el medio de capacitación (Bavister y cols., 1983).

PREPARACIÓN DEL PLASMA SEMINAL

El plasma seminal fue centrifugado a 15,000 g durante 20 min para separar a los espermatozoides de éste. El sobrenadante fué filtrado a través de membranas millipore con tamaño de poro de 0.22 μm , y almacenado en congelación a -10°C durante el periodo de capacitación (4 h.) de los espermatozoides.

CUANTIFICACIÓN DE PROTEINAS

La cuantificación de proteína total presente en el plasma seminal completo o sus fracciones, se determinó por el método de Lowry y cols. (1951), usando BSA como referencia.

EFFECTO DEL PLASMA SEMINAL SOBRE LA CAPACITACIÓN

Ai finalizar las 4 h. del periodo de capacitación, el plasma seminal de la muestra de semen en uso (filtrado y almacenado en congelación durante el tiempo de capacitación) se descongeló, se agregó a cada pozo a una concentración final de 7 mg de proteína por ml. de suspensión de espermatozoides, y se incubó durante 20, 40, y 60 min. adicionales para observar su efecto sobre la capacitación espermática.

Se evaluó el número de espermatozoides capacitados al inicio y después del periodo de 4 h. de incubación en TALP, así como después de ser incubados con plasma seminal durante 20, 40, y 60 min. adicionales. La reacción acrosomal se indujo por medio de la adición de 150 μg de zona pelúcida solubilizada (ZPs) a 30×10^6 espermatozoides en un ml. de suspensión. La reacción acrosomal inducida se evaluó a los 30 min de la adición de ZPs a las suspensiones con espermatozoides. La

ZPs fue obtenida de acuerdo al método de Dunbar y cols. (1986), que consiste en el macerado de ovarios, el aislamiento de los ovocitos por filtración a través de mallas de nylon, y la solubilización de la zona pelúcida con bicarbonato de amonio.

EVALUACIÓN DE LA CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA

La reacción acrosomal se empleó como un índice de capacitación dado que sólo los espermatozoides capacitados pueden llevarla a cabo (Berger y cols., 1989). Al inicio del presente trabajo (experimentos 1 y 2), el estado del acrosoma se evaluó de la siguiente manera: Se hicieron preparaciones sobre portaobjetos con los espermatozoides vivos, se dejaron secar al aire, y se fijaron con acetona. Las preparaciones se tiñeron con una lectina conjugada a isotiocianato de fluoresceína (200 µg/ml en PBS) (Sigma) a 37 °C durante 20 min., se lavaron con agua destilada, y fueron analizadas al microscopio de epifluorescencia (Zeiss) a 1000 aumentos, con excitación de luz azul (450-490 nm), contando al menos 200 espermatozoides por preparación.

Con esta técnica, es posible distinguir tres patrones de tinción. Los espermatozoides con el acrosoma intacto, muestran una fluorescencia uniforme a lo largo de la cabeza; en los espermatozoides que han iniciado la reacción acrosomal, se observan las fenestraciones que se efectúan durante el proceso de exocitosis; y los espermatozoides con reacción acrosomal completa, presentan una escasa o nula fluorescencia en la región del acrosoma, e intensa fluorescencia en la región ecuatorial (Berger, 1989) (Fig. 1). En este estudio, tanto los espermatozoides iniciados en la reacción acrosomal, como aquellos con reacción acrosomal completa, fueron considerados como positivos.

La metodología descrita para evaluar el estado del acrosoma se mejoró cuando el estudio avanzó (experimentos 3 al 5), al teñirse los espermatozoides con un colorante vital (Hoechst 33258) y con la lectina conjugada a fluoresceína, lo que permitió distinguir a los espermatozoides vivos de los muertos; dado que los espermatozoides muertos son permeables al colorante Hoechst, que se une al núcleo de los espermatozoides, confiriéndoles un color azul bajo el microscopio de epifluorescencia al excitar con luz ultravioleta (200-400 nm). Con esta doble tinción, se evita contar como espermatozoides con reacción acrosomal, a espermatozoides muertos que presentan daño en el acrosoma (Fig. 2).

Durante el desarrollo de todos los experimentos, la movilidad espermática se estimó en un microscopio invertido a 400 aumentos, y sólo las muestras que presentaron una movilidad superior al 60% durante todo el experimento fueron utilizadas (Berger, 1989).

FRACCIONAMIENTO DEL PLASMA SEMINAL, Y ENSAYO DEL EFECTO DE LAS FRACCIONES SOBRE LA CAPACITACIÓN

El plasma seminal fue fraccionado por ultrafiltración a través de membranas Amicon con tamaño de poro de 10, 30, 50, y 100 kDa, por el M. en C. Rodolfo Velasco Lezama, en el laboratorio de hematología de la UAM-Iztapalapa. Se obtuvieron 5 fracciones, con pesos moleculares <10, 10-30, 30-50, 50-100, y > 100 kDa.

Las fracciones de plasma seminal se agregaron a espermatozoides capacitados. Las concentraciones usadas fueron: 0, 0,5, 1, 1.5, y 2 mg de proteína por ml de suspensión celular (30×10^6 espermatozoides), y se evaluó el efecto de éstas sobre la capacitación, de la misma manera que cuando se usó plasma seminal completo.

ELECTROFORESIS DE LAS FRACCIONES DEL PLASMA SEMINAL

Para determinar la composición proteica de cada una de las fracciones del plasma seminal, se desarrollaron electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), de acuerdo con el método de Laemmli (1970). 10 μ g de proteínas totales de cada fracción se colocaron sobre un gel en placa con 7% de concentración de acrilamida, y se corrieron durante 3 h. a 125 V. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie o, para mayor sensibilidad, con plata.

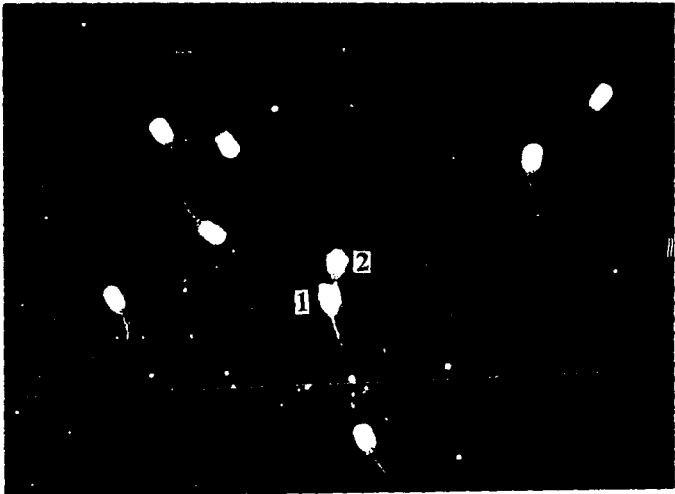
ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se analizaron estadísticamente por medio de análisis de varianza. Se consideró significancia estadística cuando p fue menor que 0.05. Para determinar la relación entre la concentración de las fracciones del plasma seminal y la capacitación espermática, se aplicó un análisis de regresión simple.

RESULTADOS

En la fig. 1 se observan los espermatozoides de cerdo después de su tinción con lectina conjugada a fluoresceína. se observan varios espermatozoides con el acrosoma intacto (fluorescencia homogénea), un espermatozoide iniciado en la reacción acrosomal (señalado con el número 1), y uno con reacción acrosomal completa (señalado con el número 2).

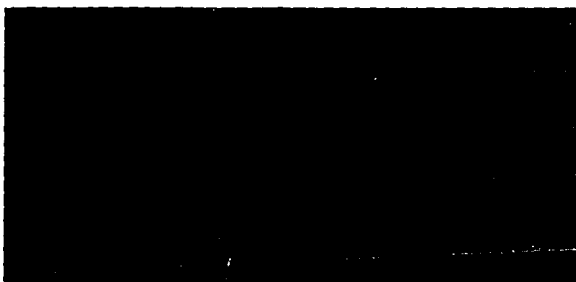
Fig. 1 Espermatozoides de cerdo teñidos con lectina conjugada a fluoresceína (400 aumentos).



En la figura 2, se observan los espermatozoides después de su tinción con Hoechst, para la evaluación de viabilidad. En el panel A se observan 5 espermatozoides en campo claro. En el panel B, se encuentran los mismos espermatozoides pero ahora iluminados con luz UV (200-400 nm) para Hoechst. Con esta técnica, los espermatozoides muertos muestran un color azul intenso.

Fig. 2 Espermatozoides de cerdo teñidos con el colorante vital Hoechst 33258

Panel A



Panel B



En el cuadro 1 se observa el efecto inhibitorio del plasma seminal porcino en el desarrollo de la reacción acrosomal espermática. El porcentaje de espermatozoides que respondieron al estímulo de la zona pelúcida solubilizada se incrementó de 10 a 58% durante el período de capacitación y, tras la adición de plasma seminal completo, el porcentaje de espermatozoides que desarrollaron reacción acrosomal se redujo al 44% a los 20 min., y al 18% a los 40 min.

A los 60 min. se observa un ligero aumento con respecto al porcentaje de espermatozoides capacitados a los 40 min., pero sin tener diferencia estadísticamente significativa.

Cuadro 1. Efecto del plasma seminal completo sobre los porcentajes de reacción acrosomal espermática en cerdo *in vitro*¹ (Promedio \pm Desviación standard de 2 eyaculados de los cerdos Landrace-23 y Duroc-28-5).

Al inicio del periodo de capacitación	Después del periodo de capacitación	Tiempo (min) de incubación con plasma seminal completo		
		20	40	60
11 \pm 1	58 \pm 5	44 \pm 6	18 \pm 3*	25 \pm 5*

¹ Los espermatozoides fueron incubados durante 4 h. en medio TALP. Al inicio y al final de este periodo, se evaluó el porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal, inducida por la adición de zona pelúcida solubilizada (ZPs). A las muestras problema, después de 4 h. de incubación en TALP, se les agregó plasma seminal completo (a concentración final de 7 mg/ml), y se continuó la incubación por los tiempos señalados, después de los cuales, se agregó ZPs, y se evaluaron los porcentajes de espermatozoides con reacción acrosomal.

*Diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto a los espermatozoides evaluados inmediatamente después del periodo de capacitación.

Los resultados del cuadro 1 indicaron la existencia de un factor estabilizante del acrosoma en el plasma seminal del porcino. El tiempo óptimo para observar su efecto sobre espermatozoides capacitados se encontró alrededor de los 40 min.

Este resultado se reprodujo en tres experimentos más (cuadro 2), en los que, además, se probó el efecto descapacitante del plasma seminal incubado bajo condiciones normales de capacitación *in vitro* (37 °C, atmósfera con 5% de CO₂, durante 4 h.). En este caso, se observó que solo el plasma seminal almacenado en congelación (4 h.) tiene un efecto inhibitorio sobre la capacitación y el desarrollo de la reacción acrosomal espermática, mientras que el plasma seminal incubado 4 h. bajo condiciones normales de capacitación *in vitro*, perdió su poder descapacitante (cuadro 2).

Cuadro 2. Efecto del plasma seminal completo almacenado en congelación, y del incubado en condiciones normales de capacitación *in vitro*, sobre los porcentajes de reacción acrosomal espermática en cerdo¹ (Promedio ± Desviación standard de 3 eyaculados de los cerdos York-24 y Landrace-23).

Al inicio del periodo de capacitación	Después del periodo de capacitación	Con plasma seminal completo almacenado en congelación	Con plasma seminal completo incubado en condiciones normales de capacitación
6 ± 2	56 ± 7	8 ± 3*	67 ± 4

¹ Los espermatozoides fueron incubados durante 4 h. en medio TALP. Al inicio y al final de este periodo, se evaluó el porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal, inducida por la adición de zona pelúcida solubilizada (ZPs). Las muestras problema, después de 4 h. de incubación en TALP, fueron incubadas durante 45 min. con plasma seminal completo almacenado durante 4 h. en congelación, o con el incubado en condiciones normales de capacitación *in vitro* (a concentración final de 7 mg/ml), se agregó ZPs, y se evaluó el porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal.

*Diferencia significativa ($p < 0.005$) con respecto a los espermatozoides evaluados inmediatamente después del periodo de capacitación.

A continuación, se procedió a realizar una caracterización inicial del factor estabilizante del acrosoma. Para determinar el intervalo de peso molecular en el que se encontraba el factor, el plasma seminal se fraccionó, y las diferentes fracciones se agregaron a una concentración final de 2 mg de proteína por ml de suspensión de espermatozoides (30×10^6) capacitados, y se dejaron actuar durante 45 min.

Solamente la fracción del plasma seminal con peso molecular superior a los 100 kDa mostró un efecto inhibitorio en el desarrollo de la reacción acrosomal espermática (cuadro 3).

Cuadro 3. Efecto de las diferentes fracciones del plasma seminal sobre los porcentajes de reacción acrosomal espermática en cerdo *in vitro*¹ (Promedio \pm Desviación standard de 3 eyaculados de los cerdos Duroc-69-3, Duroc-Ham-58-7, y York 24).

		Fracciones del plasma seminal (kDa)				
Al inicio del periodo de capacitación	Después del periodo de capacitación	<10	10-30	30-50	50-100	>100
3 \pm 1	20 \pm 4	20 \pm 3	22 \pm 9	22 \pm 2	24 \pm 1	4 \pm 2*

¹ Los espermatozoides fueron incubados durante 4 h. en medio TALP. Al inicio y al final de este periodo, se evaluó el porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal, inducida por la adición de zona pelúcida solubilizada (ZPs). Las muestras problema, después de 4 h. de incubación en TALP, fueron incubadas durante 45 min. con las diferentes fracciones del plasma seminal a una concentración final de 2 mg/ml, se agregó ZPs, y se evaluó el porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal.

*Diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto a los espermatozoides evaluados inmediatamente después del periodo de capacitación.

En el cuadro 4 se puede observar que la inhibición de la reacción acrosomal causada por la fracción del plasma seminal con peso molecular > 100 kDa fue dosis-dependiente ($r = 0.93$).

Cuadro 4. Efecto de diferentes concentraciones de la fracción del plasma seminal > 100 kDa sobre los porcentajes de reacción acrosomal espermática en cerdo *in vitro*¹ (Promedio \pm Desviación standard de 3 eyaculados de los cerdos Duroc 28-5, York 106-5, y Hampshire 5-7).

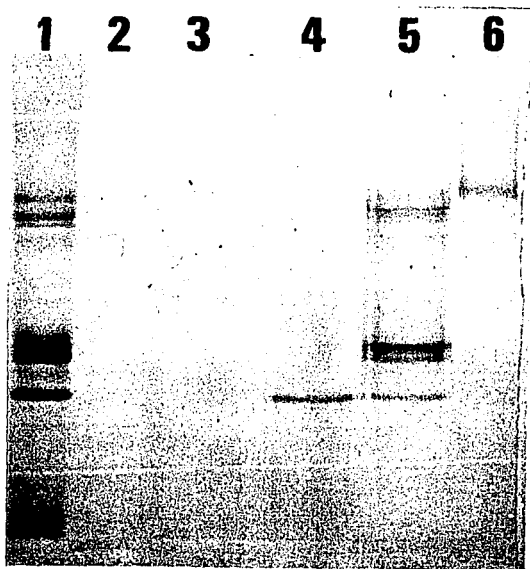
		Concentración final de la fracción del plasma seminal (mg/ml)			
Al inicio del periodo de capacitación	Después del periodo de capacitación	0.5	1.0	1.5	2.0
3 \pm 1	20 \pm 4	20 \pm 3	17 \pm 4	12 \pm 2*	4 \pm 2*

¹ Los espermatozoides fueron incubados durante 4 h. en medio TALP. Al inicio y al final de este período, se evaluó el porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal, inducida por la adición de zona pelúcida solubilizada (ZPs). Las muestras problema, después de 4 h. de incubación en TALP, fueron incubadas durante 45 min. con diferentes concentraciones de la fracción del plasma seminal > 100 kDa, se agregó ZPs, y se evaluó el porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal.

*Diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto a los espermatozoides evaluados inmediatamente después del período de capacitación.

En la Fig. 3 se observa una electroforesis SDS-PAGE en un gel al 7% de las proteínas totales del plasma seminal porcino, y de cada una de las fracciones del plasma utilizadas en este estudio. En un gel con esta concentración, las proteínas de las fracciones < 10 kDa y 10-30 kDa migran con el frente, pero permite la resolución de proteínas con pesos moleculares entre 30 y 200 kDa.

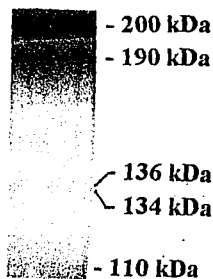
Fig. 3 ELECTROFORESIS SDS-PAGE DE LAS PROTEINAS TOTALES DEL PLASMA SEMINAL PORCINO, Y DE CADA UNA DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS.



Carriles : 1, proteínas totales del plasma seminal; 2 al 6, fracciones del plasma seminal <10, 10-30, 30-50, 50-100, y >100 kDa, respectivamente.

En la Fig. 4 se observa una electroforesis SDS-PAGE de las proteínas presentes en la fracción del plasma seminal con peso molecular > 100 kDa. Cinco bandas de proteína se resuelven, con pesos moleculares aproximados de 110, 134, 136, 190 y 200 kDa se resuelven. Alguna o algunas de éstas proteínas son las responsables del efecto inhibitorio en el desarrollo de la reacción acrosomal en espermatozoides de cerdo.

Fig. 4. ELECTROFORESIS SDS-PAGE DE LAS PROTEÍNAS PRESENTES EN LA FRACCIÓN DEL PLASMA SEMINAL CON PESO MOLECULAR > 100 kDa.



Finalmente, en el presente trabajo se tuvo interés en determinar si los factores discapacitantes del plasma seminal porcino tenían o no, naturaleza protéica, para poder establecer semejanzas o diferencias con respecto a los factores discapacitantes reportados en otras especies.

Se obtuvo evidencia de que el factor estabilizante del acrosoma porcino es de naturaleza proteica, dado que cuando el plasma seminal se trató con tripsina a una concentración final de 20 μg de la enzima por ml. de plasma durante 15 min a temperatura ambiente, deteniendo la reacción con un inhibidor de proteasas, el fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF), y después se agregó a espermatozoides capacitados a concentración final de 0.2 mM, se perdió el efecto descapacitante del plasma seminal (cuadro 5).

Cuadro 5. Efecto del plasma seminal completo tratado con tripsina sobre los porcentajes de reacción acrosomal espermática en cerdo *in vitro*¹ (Promedio \pm Desviación standard de 3 eyaculados de los cerdos Duroc 28-5 y York 106-5).

Antes del periodo de capacitación	Después del periodo de capacitación (DC)	Con plasma seminal completo sin tratar	Con plasma seminal completo tratado con tripsina	Con plasma seminal tratado con inhibidor de proteasas ²
5 \pm 1	16 \pm 3	7 \pm 2 ^a	21 \pm 4 ^b	24 \pm 5 ^b

¹ Los espermatozoides fueron incubados durante 4 h. en medio TALP. Al inicio y al final de este periodo, se evaluó el porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal, inducida por la adición de zona pelúcida solubilizada (ZPs). Las muestras problema, después de 4 h. de incubación en TALP, fueron incubadas durante 45 min. con plasma seminal completo, o tratado con tripsina, se agregó ZPs, y se evaluó el porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal.

² Dado que cuando se trató el plasma seminal con tripsina, se detuvo la reacción con el inhibidor de proteasas PMSF, este ensayo sirvió de control para descartar un posible efecto del PMSF.

^a Diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto a los espermatozoides evaluados inmediatamente después del periodo de capacitación.

^b No existe diferencia significativa con respecto a los espermatozoides evaluados inmediatamente después del periodo de capacitación.

DISCUSION

En el presente estudio se determinó la existencia en el plasma seminal del cerdo, de un factor estabilizante del acrosoma. El hecho de que el tratamiento enzimático del plasma seminal causara la pérdida de su efecto inhibitorio sobre la capacitación espermática (cuadro 5), muestra que el factor tiene naturaleza proteica. La inhibición de la reacción acrosomal causada por el factor sobre los espermatozoides capacitados fue similar a la que presentan los espermatozoides antes de ser capacitados (cuadros 1 y 2), lo cual indica una participación fundamental del factor en la capacitación y el desarrollo de la reacción acrosomal espermática en cerdo.

Dos métodos fueron empleados para evaluar la capacitación espermática en este estudio, la tinción simple, con lectina fluorescente (cuadros 1 y 2), y la tinción doble, con lectina fluorescente y Hoechst (cuadros 3 al 5). Cuando se usó el primer método, los porcentajes de espermatozoides con reacción acrosomal después del periodo de capacitación fueron altos en comparación a los encontrados cuando se usó la técnica de tinción doble. Esto se debe a que cuando se efectúa la tinción de los espermatozoides exclusivamente con la lectina conjugada a fluoresceína, es posible clasificar a un espermatozoide muerto que ha sufrido daño mecánico en el acrosoma ("falsa reacción acrosomal"), como capacitado y con reacción acrosomal. Este inconveniente se soluciona al teñir a los espermatozoides con lectina fluorescente en combinación con el colorante vital Hoechst, que difunde a través de la membrana de los espermatozoides muertos, y tiñe su núcleo, lo cual permite tomar en cuenta únicamente a los espermatozoides vivos para la evaluación de los porcentajes de reacción acrosomal.

El factor estabilizante del acrosoma reportado en el presente estudio tiene un peso molecular superior a los 100 kDa (cuadro 3). También por arriba de los 100 kDa se encuentran los factores descapacitantes reportados en el plasma seminal del conejo, con un peso molecular de 260 kDa (Thomas y cols., 1984), y el "factor antifertilidad" reportado en seres humanos, con un peso molecular de 200 kDa (Reddy y cols, 1982). En cambio, el factor descapacitante reportado por Fraser y cols. (1990) en ratón posee un peso molecular de 40 kDa.

Con respecto a su función, el factor descapacitante del plasma seminal del cerdo inhibió claramente el desarrollo de la reacción acrosomal, al igual que los factores reportados en el del conejo y del ratón. El factor antifertilidad presente en el plasma seminal humano parece no afectar directamente la capacitación, aunque existe el reporte de un factor descapacitante que afecta la reacción acrosomal en el espermatozoide de esta especie (Han y cols., 1990).

En relación al mecanismo de acción de los factores descapacitantes, se ha planteado que éstos pueden estar relacionados con un impedimento de la internalización de calcio extracelular, fundamental para el desarrollo de la reacción acrosomal.

Babcock y cols. (1979) observaron que los espermatozoides epididimarios de toro internalizan calcio rápidamente, mientras que los espermatozoides eyaculados no lo hacen, lo que sugiere que el contacto con el plasma seminal afecta su habilidad para capturar este ión. De hecho, a partir del plasma seminal de toro, ratón o rata se ha aislado una proteína denominada caltrina que actúa como inhibidor de los canales del transporte de calcio, y por tanto de la capacitación y de la reacción acrosomal espermática (Ruffo y cols, 1984; Coronel y cols., 1992).

Manjunath y cols (1993) reportaron la existencia de varias proteínas del plasma seminal de bovinos (BSP), con pesos moleculares que varían entre 15 y 30 kDa, denominadas BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3, y BSP-30 kDa, que se unen a la calmodulina, proteína localizada en la membrana citoplásmica del espermatozoide. Esta proteína es conocida por su participación en la regulación de varios procesos celulares de una manera calcio-dependiente, y su presencia ha sido demostrada en espermatozoides de cuyo, cerdo, toro, hámster y conejo. Los autores plantean que la unión de las BSP a la calmodulina impide la internalización de calcio, afectando así el desarrollo de la reacción acrosomal (Desnoyers y Manjunath, 1994).

Por otro lado, Bradley y Forrester (1982) aislaron una proteína presente en el plasma seminal de carnero y de humano que, al parecer, estimula la actividad de una ATPasa de calcio, promoviendo la salida del ión. En este caso, la eliminación de estos factores descapacitantes puede llevar a un aumento en los niveles de calcio intracelular hasta un valor necesario para que pueda ocurrir la reacción acrosomal.

Los trabajos anteriormente citados sustentan que el mecanismo de acción de los factores descapacitantes es el de mantener bajos los niveles de calcio intracelular, impidiendo de esta manera el desarrollo de la reacción acrosomal. Sin embargo, existe el reporte de factores descapacitantes que no afectan a la reacción acrosomal. Reddy y colaboradores (1982) aislaron un factor del plasma seminal humano, denominado AF-1, que previene la penetración del espermatozoide a través de la zona pelúcida y, en consecuencia, la fertilización, pero no impide el desarrollo de la reacción acrosomal. El mecanismo de acción de este tipo de factores descapacitantes es aún desconocido.

El origen de algunos de los factores discapacitantes, ha sido determinado produciendo anticuerpos monoclonales y policlonales en contra de ellos, y efectuando técnicas inmunohistoquímicas. Se ha encontrado que algunos factores discapacitantes, como el de ratón y el de conejo, se producen en el epidídimo (Han, 1990), mientras que el origen de otros factores, como el del cerdo, reportado en este estudio, o el del humano, aún está por ser determinado .

La participación del epidídimo no está limitada a la síntesis de moléculas que previenen la capacitación y el desarrollo de la reacción acrosomal espermática, ya que se han reportado otro tipo de factores que, sin duda, juegan un papel importante en el proceso de la fertilización. En el cerdo, Dacheux y Dacheux (1988) reportaron una "antiaglutinina", con un peso molecular de 250 kDa, que, como su nombre lo indica, previene la aglutinación de los espermatozoides. Peterson y Hunt (1989), describieron a las "espermadhesinas", moléculas con pesos moleculares de 30, 45, y 70 kDa, que tienen afinidad tanto por los espermatozoides, como por la zona pelúcida de cerdo, por lo que se ha planteado que pueden participar en la unión entre los gametos masculino y femenino.

En los últimos años el campo de estudio de los factores discapacitantes se ha vuelto muy amplio dado que, al parecer, existe más de un factor discapacitante por especie (Han y cols., 1990). Debido a su importancia en la capacitación y fertilización, actualmente existe un gran interés en identificarlos, aislarlos, caracterizarlos bioquímicamente, y fundamentalmente, investigar sobre su mecanismo de acción, lo cual nos permitirá esclarecer varios eventos moleculares asociados a la capacitación espermática que, a 40 años de estudio, aún permanecen por ser determinados.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

CONCLUSIONES

1) En el plasma seminal porcino existen factores descapacitantes que previenen específicamente el desarrollo de la reacción acrosomal espermática ("factores estabilizantes del acrosoma").

2) Los factor estabilizante del acrosoma del espermatozoide de cerdo tienen peso molecular superior a los 100 kDa, y

3) Son de naturaleza proteica.

DIRECCIÓN FUTURA DE LA INVESTIGACIÓN

En el trabajo presentado se determinó la existencia de factores descapacitantes en el plasma seminal del cerdo, y se realizó una caracterización inicial de éstos. Sin embargo, se necesita hacer una caracterización completa de los factores descapacitantes. Se debe determinar el peso molecular exacto de los factores, dado que en este estudio sólo se ha determinado que tienen un peso molecular superior a los 100 kDa. Se debe determinar la estructura primaria de sus cadenas peptídicas, si se encuentran glucosiladas, y su origen en el tracto reproductivo masculino. Es importante determinar si los factores descapacitantes del cerdo previenen, además de la capacitación espermática, la fertilización tanto *in vitro* como *in vivo*. Una vez realizadas estas pruebas, se puede plantear la posibilidad de utilizar a los factores descapacitantes para controlar la natalidad en seres humanos, y en otras especies animales que, por tener tasas de reproducción elevadas, presentan un problema económico y/o de salud a la sociedad, como son los perros en la ciudad de México.

BIBLIOGRAFIA

Austin, C.R. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. Aust. J. Sci. Res. 4: 581-596, 1951.

Babcock, D.F., Singh, J.P., y H.A. Lardy. Alteration of membrane permeability to calcium ions during maturation of bovine spermatozoa. Dev. Biol. 69:85-93, 1979.

Bains, H.K., Pabst, M.A., y Bawa, S.R. Changes in the lectin binding sites on the testicular, epididymal, vas, and ejaculated spermatozoon surface of dog. Andrologia, 25: 19-24, 1993.

Bavister, B.D., Leibfried, M.L., y Lieberman, G. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. Biol. Reprod. 28: 235-239, 1983.

Bedford, J.M.. Experimental requirement for capacitation and observations on ultra-structural changes in rabbit spermatozoa. J. Reprod. Fertil. 2:35-48, 1967.

Benoff, S., Cooper, G.W., Hurley, I., Mandel, F.S., y Rosenfeld, D.L. Antisperm antibody binding to human sperm inhibits capacitation induced changes in the levels of plasma membrane sterols. Am. J. Reprod. Immunol. 30: 113-130, 1993.

Berger, T. Pisum sativum agglutinin used as an acrosomal stain of porcine and caprine sperm. Theriogenol., 33:689-695, 1989.

Berger, T., Turner, K.O., Meizel, S., y Hedrick, J.L. Zona pellucida induced acrosome reaction in boar sperm. Biol. Reprod., 40:535-530, 1989.

Betancourt, M., Fierro, R., y Ambríz, D. *In vitro* fertilization of pig oocytes matured in vitro. Theriogenol., 49:1155-1160, 1993.

Bradley, M.P., y Forrester, I.T. Human and ram seminal plasma both contain a calcium-dependent regulator protein, calsemin. J. Androl., 3:289-296, 1982.

Bonilla, E., Amador, A., y Betancourt, M. *In vitro* capacitation of pig sperm in a protein-free medium supplemented with histidine and cysteine. Med. Sci. Res., 22: 725-726, 1994.

Cooper, T.G. Epididymal proteins and their clinical relevance. Andrologia 22:155-65, 1990.

Chang, M.C. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 168: 997-998, 1951.

Chang, M.C. A detrimental effect of seminal plasma on the fertilizing capacity of sperm. *Nature* 179: 258-259, 1957.

Coronel, C.E., Winnica, D.E., Novella, M.L., y Lardy, H.A. Purification, Structure, and characterization of caltrin proteins from seminal vesicle of the rat and mouse. *J. Biol. Chem.*, 267: 20909-20915, 1992.

Dacheux, F., y Dacheux, J.L. Immunocytochemical localization of antagglutinin in the boar epididymis. *Cell Tiss. Res.*, 252:329-337, 1988.

De Jongue, C.J., Han, H.L., Mack, S.R., y Zaneveld, L.J.D. Modulation of the human sperm acrosome reaction by effectors of the adenylate cyclase/cyclic AMP second-messenger pathway. *J. Exp. Zool.* 258:113-125, 1991.

Desnoyers, L., y Manjunath, P. Major proteins of bovine seminal fluid bind to insulin-like growth factor-II. *J. Biol. Chem.*, 269:5776-5780, 1994.

Dunbar, B.S., Timmons, T.M., Maresh, G.A., Niu, E.M., y Skinner, S.M. Species variation of zona pellucida antigens. en: *Reproductive Immunology*, Clarck D.A. y Croy, B.A. editores, Elsevier: New York, 1986, pp 116-124.

Ehrenwald, E., Parks, J.E., y Foote, R.H. Effects of reducing sperm cholesterol on penetration of zona-free hamster and *in vitro* matured bovine ova. *Gamete Res.*, 20:413-420, 1988.

Eng, L.A. y Oliphant, G. Rabbit sperm reversible decapacitation by membrane stabilization with a highly purified glycoprotein from seminal plasma. *Biol. Reprod.* 19: 1083-1094, 1978.

Fierro, R.C., Bonilla, E., y Betancourt, M. El uso de anticuerpos en estudios del proceso de fertilización en mamíferos. *Ciencia*, 42:277-282, 1991.

Fierro, R., Bonilla, E., Casas, E., Jiménez, I., Ducolomb, Y., y Betancourt, M. Inhibition of pig oocytes *in vitro* fertilization by the action of pig oocyte zona pellucida components. *Theriogenol.* 42:227-234, 1994.

Fraser, L.R. Mouse sperm capacitation *in vitro* involves loss of a surface-associated inhibitory component. *J. Reprod. Fert.*, 72:373-384, 1984.

Fraser, L.R. Calcium Channels play a pivotal role in the sequence of ionic changes involved in initiation of mouse sperm acrosomal exocytosis. *Mol. Reprod. Dev.*, 36: 368-376, 1993.

Fraser, L.R., y Ahuja, K.K. Metabolic and surface events in fertilization. *Gamete Res.*, 20:491-519, 1988.

Fraser, L.R., Harrison, R.A.P., y Herod, J. E. Characterization of a decapacitation factor associated with epididymal mouse spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 89:135, 1990.

Han, H.L., Mack, S.R., De Jonge C., y Zaneveld, L.J.D. Inhibition of the human sperm acrosome reaction by a high molecular weight factor from human seminal plasma. *Fert. Steril.*, 6:1177-1179, 1990.

Hedrick, J.L., Wardrip, N.J., y Berger, T. Differences in the macromolecular composition of the zona pellucida isolated from pig oocytes, eggs, and zygotes. *J. Exp. Zool.*, 241:257-262, 1987.

Kline, D., y Savage, J.S. The timing of cortical granule fusion, content dispersal, and endocytosis during fertilization of the hamster egg: An electrophysiological and histochemical study. *Dev. Biol.*, 62: 277-287, 1994.

Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature* 227: 680-685, 1970.

Langlais, J., Kan, F., Granger, L., Raymond, L., Bleau, G., y Roberts, K. Identification of sterol acceptors that stimulate cholesterol efflux from human spermatozoa during *in vitro* capacitation. *Gamete Res.*, 20:185-201, 1988.

Longo, F.J. Biological processes of fertilization. en *Reproductive Toxicology*, R.L. Dixon ed., Raven Press: New York, 1985, pp 173-189.

Lowry, O.H., Rosenberg, M.J., Farr, A.L., y Randall, R. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275, 1951.

Manjunath, P., Chandonnet, L., Baillargeon, L., y Roberts, K.D. Calmodulin-binding proteins in bovine semen. *J. Reprod. and Fertil.*, 97:75-81, 1993.

Moore, H.D.M., Hartman, T.D., Brown, A.C., Smith, C.A., y Ellis, D.H. Expression of sperm antigens during spermatogenesis and maturation detected with monoclonal antibodies. *Exp. clin. Immunogenetics* 2:84-96, 1985.

Parks, J.E., y y Hough, S.R. Platelet-activating factor acetylhydrolase activity in bovine seminal plasma. *J. Androl.*, 14: 335-339, 1993.

Peterson, R.N., y Hunt, W.P. Identification, isolation, and properties of a plasma membrane protein involved in the adhesion of boar sperm to the porcine zona pellucida. *Gamete Res.*, 23:103-118, 1989.

Peterson, R.N., Russell, L.D., y Hunt, W.P. Evidence for specific binding of uncapacitated boar spermatozoa to porcine zona pellucidae. *J. Exp. Zool.*, 231:131-147, 1984.

Peterson R.N., Campbell, P., Hunt, W.P., y Bozzola, J.J. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis characterization of APz, a sperm protein involved in zona binding in the pig and evidence of its binding to specific zona glycoproteins. *Mol. Reprod. and Develop.* 28:260-271, 1992.

Pholpramool, C., Lea, O.A., Burrow, P.V., Dott, H.M., y Setchell, B.P. The effect of acidic epididymal glycoprotein (AEG) and some other proteins on the motility of rat epididymal spermatozoa. *Int. J. Androl.*, 6:240-248, 1983.

Reddy, J.M., Stark, R.A. y Zaneveld, L.J.D. A High molecular weight antifertility factor from human seminal plasma. *J. Reprod. Fert.*, 57: 437-440, 1979.

Reddy, J.M., Audhya, T.K., Goodpasture, J.C., y Zaneveld, L.J.D. Properties of a highly purified antifertility factor from human seminal plasma. *Biol. Reprod.*, 27:1076-1083, 1982.

Roldán, E.R.S., y Harrison, R.A.P. Polyphosphoinositide breakdown and subsequent exocytosis in the calcium/ionophore- induced acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Biochem. J.*, 259:397-406, 1989.

Ruffo, G.A., Schoff, P.K., y Lardy, H.A. Regulation of calcium content in bovine spermatozoa. *J. Biol. Chem.*, 259:2547-2552, 1984.

Shabanowitz, R.B. y O'Rand, M.G. Characterization of the human zona pellucida from fertilized and unfertilized eggs. *J. Reprod. Fert.*, 82: 151-155, 1988.

Sidhu, K.S., y Guraya, S.S. Effect of calmodulin-like protein from buffalo (*Bubalus bubalis*) seminal plasma on Ca, Mg-ATPase of purified plasma membrane of buffalo spermatozoa. *Andrologia*, 25:25-28, 1993.

Stein, D.M., y Fraser, L.R. Cyclic nucleotide metabolism in mouse epididymal spermatozoa during capacitation. *Gamete Res.*, 10:283-299, 1984.

Susuki, F. Changes in the distribution of intramembranous particles and Filipin-sterol complexes during epididymal maturation of golden hamster spermatozoa. *J. Ultrastruc. Mol. Struct. Res.*, 100:39-54, 1988.

Tesarik, J., y Flechon, J. Distribution of sterols and anionic lipids in human sperm plasma membrane: effects of in vitro capacitation. *J. Ultrastruc. Mol. Struct. Res.*, 97:227-237, 1986.

Thomas, T.S., Reynolds, A.B., y Oliphant, G. Evaluation of the site of synthesis of rabbit sperm acrosome stabilizing factor using immunocytochemistry and metabolic labeling techniques. *Biol. Reprod.*, 30:693-795, 1984.

Thomas, P., y Meizel, S. An influx of extracellular calcium is required for initiation of the human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 20:397-411, 1988.

Tulsiani, D.R.P., Skudlarek, M.D., Holland, M.K., y Orgebin-Crist, M.C. Glycosylation of rat sperm plasma membrane during epididymal maturation. *Biol. Reprod.*, 48:417-428, 1993.

Wassarman, P.M. Regulation of mammalian fertilization by gamete adhesion molecules. en: *Spermatogenesis-Fertilization-Contraception*, E. Nieschlag y V.F. Habenicht editores, Springer-Verlag: Berlín, 1992, pp 345-362.

Yanagimachi, R. Requirement of extracellular calcium ions for various stages of fertilization and fertilization related phenomena in the hamster. *Gamete Res.* 5:323-344, 1982.

Yanagimachi, R. Mammalian Fertilization. en: *The Physiology of Reproduction*, E. Knobil and J.D. Neill editores, Raven Press, Ltd: New York, 1994, pp 189-317.

Yeagle, P.L. Lipid regulation of cell membrane structure and function. *FASEB J.*, 3:1833-1842, 1989.