



# ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES DE IZTACALA

LOCALIZACION DE LA CALMODULINA EN LOS  
GAMETOS MASCULINO Y FEMENINO DURANTE  
SU INTERACCION EN LA FERTILIZACION  
HETEROLOGA

T E S I S  
PARA OBTENER EL TITULO DE:  
B I O L O G O  
Presentada por  
MA. LUISA LABRA BARRIOS

1990

Los Reyes Iztacala, Estado de México



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, bajo la asesoría y dirección de la Dra. Adela Mójica, a quien agradezco infinitamente su paciencia, gran dedicación y confianza para que este trabajo se realizara.

Para el trabajo de microscopia de fluorescencia se utilizó el equipo de la Unidad de Microscopia Electrónica del Departamento de Biología Celular (CINVESTAV).

La autora de este trabajo fue becaria durante seis meses del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN y de la Escuela Nacional de Estudios Profesionales de Iztacala-UNAM, durante un año.

Este trabajo fue apoyado parcialmente por CONACYT con el donativo del proyecto P028CCOX891518.

El presente trabajo está dedicado de manera muy especial a :

MIS PADRES : Julia Barrios Sánchez y Felipe Labra Ramirez por su amor y dedicación para lograr mi formación como profesionista. Infinitamente, gracias por creer en mi.

MIS HERMANOS : Guadalupe, Roberto, Juanita, Socorro, Felipe, Susy y Ady, por toda la confianza y paciencia que depositaron en mi.

MI MEJOR AMIGO : Benito, por su cariño, comprensión, ayuda y por toda la felicidad que me ha brindado.

TODOS MIS AMIGOS Y COMPANEROS : Por sus consejos y ayuda incondicional.

**AGRADECIMIENTOS** : Agradezco a las siguientes personas que contribuyeron a la realización del presente trabajo:

A Raquel Trejo, por la asesoría recibida en la obtención de anticuerpos.

Enrique O. Hernández, por todos los anticuerpos donados.

Leticia Moreno por sus valiosas sugerencias.

Begoffa Campos, por la enseñanza en la técnica de obtención de óvulos.

Ricardo Mondragón por la asesoría y adiestramiento en el manejo del microscopio de fluorescencia.

José Aceves, por su ayuda técnica.

## INDICE

Resumen

### INTRODUCCION

La fertilización-----	1
Preparación del espermatozoide de los mamíferos para la fertilización-----	3
Maduración del espermatozoide-----	3
Capacitación-----	3
La reacción acrosomal-----	4
La interacción del óvulo con el espermatozoide-----	5
Penetración de la zona pelúcida-----	6
La fusión de las membranas plasmáticas de los gametos y la incorporación del espermatozoide al óvulo-----	6
Bloqueo de la polispermia-----	8
La descondensación del núcleo espermático, la formación de los pronúcleos y la singamia-----	9
ANTECEDENTES	
El ión calcio y la calmodulina-----	12
Objetivos-----	17
MATERIAL Y METODOS	
Reactivos-----	18
Obtención de los espermatozoides-----	19
Selección de las muestras y lavado de los espermatozoides-----	19
Cuantificación de los espermatozoides-----	20
Incubación para la capacitación de los espermatozoides-----	20
Superovulación del hámster-----	21

Obtención de los óvulos del hámster-----	21
Liberación de los óvulos de sus envolturas-----	23
Fertilización heteróloga in vitro-----	24
Valoración de la fertilización heteróloga-----	25
Tratamiento de los gametos con trifluoroperazina-----	26
Tratamiento de los óvulos con anticuerpos anticalmodulina o con inmunoglobulinas G de suero de borrego no inmune-----	27
Tratamiento de los gametos con EGTA-----	27
Inmunolocalización de calmodulina en los gametos-----	28
Detección de la calmodulina (IFI) en los espermatozoides-----	28
Detección de la calmodulina (IFI) en los óvulos-----	30
RESULTADOS	
El bloqueo de sitios antigénicos no específicos para el anticuerpo anticalmodulina-----	32
Localización de la calmodulina en los óvulos sin zona pelúcida o desnudos-----	33
Localización de la calmodulina en los óvulos sin zona pelúcida no permeabilizados-----	34
Detección de la calmodulina en óvulos vivos-----	36
Detección de la calmodulina en la zona pelúcida-----	38
Localización de la calmodulina en los espermatozoides durante su capacitación y reacción acrosomal-----	39
Fertilización heteróloga in vitro-----	42
Visualización de la fertilización con el reactivo de Hoechst 33258-----	43
Efecto de la ausencia de calcio o de potasio, en la fertilización-----	46
Inmunolocalización de la calmodulina en los gametos durante la	

fertilización-----	47
Efecto de la trifluoroperazina sobre los espermatozoides y en la interacción óvulo-espermatozoide-----	50
Efecto de los anticuerpos anticalmodulina y de las IgGs de suero de borrego, no inmune, sobre la fertilización-----	51
DISCUSION	
Localización de la calmodulina en los óvulos desnudos fijados y permeabilizados-----	54
Localización de la calmodulina en los óvulos fijados no permeabilizados-----	57
Localización de la calmodulina en óvulos vivos-----	58
Detección de la calmodulina en la zona pelúcida-----	58
Localización de la calmodulina en los espermatozoides-----	59
El sistema de fertilización heteróloga-----	60
Distribución de la calmodulina en los óvulos fertilizados-----	61
Efecto de la trifluoroperazina-----	62
Efecto de los anticuerpos antiCaM en la interacción óvulo-espermatozoide-----	64
Conclusiones-----	66
BIBLIOGRAFIA	
Bibliografía-----	69

## RESUMEN

En la fertilización, la fusión del espermatozoide con el óvulo, se requiere la presencia de calcio en el medio de incubación. En múltiples procesos celulares en los que interviene el calcio, la calmodulina (CaM) ha mostrado ser la mediadora de las acciones del ión. El interés de este trabajo fue el de conocer: si en el mecanismo de fusión de las membranas plasmáticas de los gametos la CaM media una función, sugerida pero aun desconocida, del calcio. En el presente trabajo fue estudiada la localización de la calmodulina por inmunofluorescencia indirecta: 1) en los óvulos del hámster con zona pelúcida o carentes de ella, 2) en los espermatozoides del cuyo durante su capacitación y reacción acrosomal, *in vitro*, en el medio MCM-PL y 3) en los gametos durante su coincubación en el medio MCM-PL con Ca y K. Se valoró, el efecto de la trifluoroperazina, inhibidor de la calmodulina, y la presencia del anticuerpo anticalmodulina sobre la fertilización. Se produjo la superovulación en la hámster, por tratamiento hormonal. Los óvulos se liberaron de las células de la granulosa por tratamiento con hialuronidasa y de la zona pelúcida con tripsina o de manera mecánica. La fertilización se valoró en óvulos vivos, por microscopia de contraste de

fases y en óvulos fijados, por tinción del DNA, con el reactivo de Hoechst 33258. En óvulos fijados, permeabilizados o no, la calmodulina fue observada: 1) en la periferia de las células, 2) formando un entramado aparentemente en el interior, 3) en el cuerpo polar y 4) bordeando el sitio en el que se liberó éste último. En general, los óvulos pequeños (de diámetro) presentaban menos calmodulina. La mayor tinción periférica, que presentaron los óvulos desnudados de manera mecánica, los que no fueron permeabilizados y los teñidos *in vivo*, sugiere la presencia de CaM en el exterior de la célula. La presencia de CaM en la región postacrosomal de los espermatozoides con reacción acrosomal fue confirmada. Se observó un cambio de distribución de la CaM en el óvulo, hasta las 3 h de la fertilización. Los anticuerpos anti-CaM, pero no la TFP, inhibieron la fertilización.

## INTRODUCCION

## La fertilización

La fertilización ha sido un tema de gran interés para los científicos por más de un siglo, por su papel fundamental en la preservación de las especies (1). Durante los últimos 30 años, grandes avances han sido logrados en el conocimiento de la fisiología, morfología y bioquímica de las células involucradas en este proceso. La fertilización es definida como la fusión del óvulo con el espermatozoide a nivel de sus membranas plasmáticas (2), y para otros, comprende hasta la singamia (3).

Los estudios clásicos de la fertilización y el desarrollo embrionario temprano, han predominantemente involucrado la utilización de gametos de animales que exhiben fertilización externa. Consecuentemente, mucha de la suma total de nuestro conocimiento acerca de estos procesos se deriva de la investigación en dichos animales, particularmente la realizada en invertebrados marinos. En éstos, tanto los óvulos como los espermatozoides son ideales para su análisis por dos razones principales: La primera es que la fecundación y el subsecuente desarrollo del huevo fácilmente ocurren en el laboratorio después de la interacción de los gametos en el agua de mar. La segunda, es la gran cantidad de gametos de ambos

sexos, que puede ser obtenida facilitando las investigaciones a niveles bioquímico y molecular. Estas ventajas fundamentan el gran progreso que se ha hecho en el entendimiento de los procesos que tienen lugar antes, durante y después de la fertilización (4). Mientras que los estudios en invertebrados continúan para ser en muchas formas un modelo de selección para la investigación, el interés ha naturalmente girado hacia el conocimiento de la fertilización en los mamíferos. Desafortunadamente, mientras algunos procesos básicos involucrados en la fertilización de estos dos grupos parecen en muchas formas similares entre sí, en otros procesos existen disparidades fundamentales que evitan la simple extrapolación de resultados.

Por la inaccesibilidad a los gametos de los mamíferos en su medio ambiente natural, muchos investigadores han enfocado su atención al estudio de la fertilización bajo condiciones *in vitro*. Los primeros ensayos para lograr la fertilización de óvulos de mamíferos *in vitro*, datan de 1878 (Shenk, citado en 4). La evidencia inobjetable de la ocurrencia de la fertilización *in vitro* fue conseguida en óvulos de conejo por Chang en 1959 y con ello el estudio de los mecanismos de las reacciones que tienen lugar en ella, fue considerablemente facilitado; además se han hecho progresos adicionales con el uso de medios de cultivo definidos (5). Así, algunos factores necesarios para las diversas etapas del proceso han podido ser identificados. En la actualidad, la

fertilización de los óvulos de mamíferos *in vitro* ha sido extendida a otras muchas especies tales como el hámster, ratón, rata, cuyo y al ser humano entre otros (6).

Preparación del espermatozoide de los mamíferos para la fertilización

Maduración del espermatozoide. El espermatozoide testicular de los mamíferos no tiene la capacidad de penetrar a los óvulos. Su potencialidad fertilizante la va adquiriendo conforme pasa a través del epididimo. Este proceso aparentemente es único de los mamíferos y es referido como maduración epididimal del espermatozoide (7).

Capacitación. Aún después de su maduración epididimal, el espermatozoide de los mamíferos requiere de una fase adicional de maduración dentro del tracto reproductor femenino, antes de ser capaz de fertilizar óvulos (12). Este fenómeno fue descrito por Chang y por Austin en 1951 de manera independiente (citado en 4 y 7) y fue referido posteriormente como capacitación (Austin, 1952; citado en 7). Actualmente la capacitación se define como los cambios fisiológicos y estructurales que deben ocurrirle al espermatozoide, para que éste sea capaz de sufrir la reacción acrosomal (RA), proceso necesario para que el espermatozoide pueda fertilizar al gameto femenino (2).

El tiempo requerido para que la capacitación ocurra varía con las especies. Por otra parte, no hay evidencia de alguna necesidad de capacitación de los espermatozoides de los invertebrados con fertilización externa. En éstos, la RA ocurre en forma instantánea cuando el espermatozoide hace contacto con la gelatina del óvulo (1). Así, la capacitación parece ser una adaptación asociada con la fertilización interna. Es un proceso reversible (15) cuya secuela es la reacción acrosomal. Las bases moleculares de la capacitación no están bien establecidas, pero hay varias líneas de evidencia que indican que el proceso de capacitación involucra entre otras, modificaciones moleculares a nivel de la membrana plasmática y un incremento de la permeabilidad al ión calcio, necesario para la reacción acrosomal (9).

La reacción acrosomal. El acrosoma del espermatozoide es un organelo que cubre la región anterior del núcleo y su origen es lisosomal (1). El espermatozoide capacitado para poder fertilizar debe perder su acrosoma, es decir, sufrir la reacción acrosomal (10). Este proceso involucra: 1) la formación de múltiples sitios de fusión, originándose vesículas nuevas de la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática que la rodea. Esto produce a su vez, la formación de poros a través de las membranas. Esta reacción es considerada como un proceso de exocitosis. 2) la vesiculación de las membranas permite la liberación del contenido acrosomal,

compuesto de una variedad de enzimas hidrolíticas incluyendo proteinasas, glicosidasas, y fosfatasas. Algunas de éstas pueden ser componentes integrales de la membrana acrosomal interna y actuar como receptores del espermatozoide que se unen a la zona pelúcida del óvulo (11); 3) la exposición de la membrana acrosomal interna del espermatozoide con sus enzimas asociadas; 4) a nivel del segmento ecuatorial del acrosoma, la refusión de la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa residual, para mantener una membrana limitante continua después de la RA (1). El segmento ecuatorial del acrosoma al parecer está excluido de los eventos de fusión de membranas en la RA, sin embargo, sus propiedades de reconocimiento cambian una vez que la RA ha ocurrido (8,15).

La interacción del óvulo con el espermatozoide

El ámpula del oviducto es el sitio donde ocurre la fertilización *in vivo*, de los ovocitos recientemente ovulados rodeados en general por las células del cumulus oophorus y asociadas al fluido folicular (7,12).

Aunque ha sido propuesto que tanto las células del cumulus como el fluido asociado, juegan un papel específico en la capacitación del espermatozoide (3), hay evidencias obtenidas en muchas especies, de estudios *in vivo* e *in vitro*, que sugieren que ni los fluidos ni las investimentas del óvulo son factores esenciales para la aparición de la reacción

acrosomal, secuela de la capacitación (3).

Penetración de la zona pelúcida. Una vez que el espermatozoide ha sufrido la reacción acrosomal es, teóricamente, competente para penetrar la zona pelúcida. La zona pelúcida de los óvulos de los mamíferos es una capa acelular, relativamente gruesa, compuesta de tres familias de glicoproteínas: ZP 1, ZP 2 y ZP 3 (13,14). La especificidad de especie en la fertilización de óvulos nativos intactos reside primeramente en la zona pelúcida (15). Las evidencias indican, que la penetración de la zona pelúcida es precedida por interacciones, entre moléculas de la superficie del espermatozoide y receptores específicos para ellos en la zona pelúcida (3). En estas interacciones participan, al menos en parte, varios residuos de azúcares incluyendo a la N-acetilglucosamina y a la fucosa (20). Algunos espermatozoides, como los del cuyo y el del hombre, nunca se unen o penetran la zona pelúcida de óvulos heterólogos (7,13).

La fusión de las membranas plasmáticas de los gametos y la incorporación del espermatozoide al óvulo. Bajo condiciones naturales el espermatozoide que se fusiona con la membrana plasmática del óvulo sufrió la reacción acrosomal antes de la penetración de la zona pelúcida. Además todas las evidencias experimentales *in vitro* demuestran que sólo aquellos espermatozoides que expresan la reacción acrosomal son capaces

de fertilizar a los óvulos liberados de la zona (6,7,10,15). Los mecanismos por los cuales la reacción acrosomal hace capaces a los espermatozoides para fusionarse con la membrana plasmática de los ovocitos son desconocidos. Lo que parece cierto es, que la membrana plasmática del segmento ecuatorial y de la región postacrosomal del espermatozoide cambian radicalmente, como resultado de la RA. Se ha observado que emergen zonas libres de partículas en la membrana plasmática sobre estas regiones (8). La formación de estas áreas libres de partículas posiblemente permita a la membrana del espermatozoide fusionarse con el oolema (10,15).

Los óvulos de los mamíferos están cubiertos por numerosas microvellosidades excepto en la región que cubre el huso meiótico y la fusión del espermatozoide raramente ocurre aquí (3).

El contacto inicial óvulo-espermatozoide involucra una asociación entre las microvellosidades y la cabeza del espermatozoide (21). La identificación de la región específica de la cabeza espermática donde la fusión con el óvulo es iniciada, ha sido tema de discusión sin tener hasta ahora resultados definitivos. Algunos estudios estructurales tempranos sugieren que la región postacrosomal es el sitio en cuestión (3) mientras que Bedford (8) sugiere al segmento ecuatorial. El hecho de que la mayoría, sino es que todos, los espermatozoides que atraviesan la zona pelúcida en un óvulo

intacto retienen al segmento ecuatorial, han hecho a este segmento un candidato atractivo para la tarea especializada de fusión con el óvulo. Otros autores sugieren, que ambas regiones son capaces de participar en el reconocimiento del óvulo, dependiendo de especies y circunstancias.

Una vez que la fusión se inicia, la incorporación completa del espermatozoide procede bastante rápido y, al menos en el ratón, en poco tiempo (diez minutos) la cabeza del espermatozoide se encuentra en el citoplasma del óvulo. El flagelo es incorporado en un periodo de varias horas (3,7,8,19). En la incorporación del espermatozoide participan las microvellosidades del óvulo (15).

**Bloqueo de la polispermia.** La fusión del espermatozoide fertilizante con la membrana del óvulo dispara en éste una compleja serie de respuestas, las cuales incluyen entre otras, a la reacción cortical. Esta consiste en la exocitosis de los gránulos corticales adosados a la cara interna de la membrana plasmática del óvulo. Su contenido es descargado al espacio perivitelino siguiendo a la fusión entre las membranas de los gránulos y del óvulo. Las interacciones que ocurren entre el material de los gránulos corticales y la zona pelúcida y/o la membrana plasmática del óvulo son importantes en la prevención de la polispermia (16,17). Como consecuencia de la reacción cortical se originan cambios en la zona pelúcida, los cuales se denominan en conjunto como reacción de la zona (15). La zona

pelúcida puede volverse impermeable a más espermatozoides además de endurecerse y/o volverse más resistente a agentes líticos. Se sugiere que el primer cambio es debido a la acción de una enzima tipo tripsina, y el último a la acción de una ovoperoxidasa, las cuales son liberadas de los gránulos corticales. Por otra parte, se ha demostrado que alteraciones en la membrana plasmática del óvulo, como cambios en sus propiedades eléctricas, pueden evitar la fusión de espermatozoides adicionales; y que dichas alteraciones pueden ser el resultado de la acción del material de los gránulos corticales.

El grado de polispermia está relacionada a la concentración de espermatozoides y refleja múltiples fusiones sincrónicas (3). Uno de los mecanismos que se ha sugerido para la entrada del espermatozoide a través de la zona pelúcida es la hidrólisis enzimática de la zona por una enzima (acrosina) que lleva unida el espermatozoide con RA en la membrana acrosomal interna. Este agente lítico es referido como lisina de la zona (15). Al parecer la movilidad hiperactivada del espermatozoide que ha sufrido la RA también es un factor determinante en la penetración de la zona pelúcida (7,18).

La descondensación del núcleo espermático, la formación de los pronúcleos y la singamia. Previo a la descondensación de la cabeza espermática ocurre el rompimiento de su envoltura. La descondensación de la cromatina espermática, altamente

empaquetada, involucra la ruptura de puentes disulfuro de sus proteínas. En el hámster, Yanagimachi (7) ha reportado que la descondensación de la cabeza del espermatozoide puede ser detectada, 30 a 40 minutos después del contacto inicial entre los gametos. El flagelo y sus componentes se desintegran posteriormente en el citoplasma del óvulo.

Los puntos finales de mayor control durante la fertilización involucran la completa descondensación de la cromatina de ambos gametos y la formación de los pronúcleos respectivos. Sin estos eventos, la unión final de los genomas, de ambas células, no ocurre. El control de la formación pronuclear es poco comprendido, aunque no parece ser específico de especies; al menos en algunos casos, la penetración heteroespecífica es proseguida hasta la formación de los pronúcleos (15).

Los estadios iniciales de la formación pronuclear ocurren en la región cortical del óvulo. El pronúcleo espermático en desarrollo con frecuencia forma una protuberancia en la periferia del óvulo. Inicialmente, el pronúcleo del óvulo está también localizado en la periferia, debido a la reciente terminación de la segunda división meiótica y la extrusión del segundo cuerpo polar. Ambos pronúcleos gradualmente migran hacia el centro del óvulo donde, justo antes de la primera división mitótica, las envolturas de los pronúcleos se rompen y la cromatina derivada del óvulo se mezcla con la del espermatozoide. Con esta unión, denominada

"singamia", el espermatozoide completa su tarea y el proceso entero de la fertilización finaliza.

## ANTECEDENTES

### El ión calcio y la calmodulina

El ión calcio desencadena procesos biológicos tan diversos como la contracción muscular, la secreción hormonal (28), la maduración de las células y participa la división mitótica y meiótica (22); la endo y exocitosis y la movilidad de cilios y flagelos (48). Este ión se cuenta entre los segundos mensajeros en las células de los seres vivos (22).

Está bien establecido que el ión calcio se ve involucrado en varios procesos relativos a la fertilización (23-26). Así, regula la movilidad de los espermatozoides (23,48). En la inducción de la reacción acrosomal, su participación es indispensable (24). Yanagimachi y otros investigadores han demostrado que el calcio es necesario para la penetración del espermatozoide a través de la zona pelúcida (29). También se ha comunicado que durante la interacción de los gametos para su fusión y en la penetración del óvulo por el espermatozoide, la presencia del calcio en el medio de incubación, es un requisito (23,25,26). Por otra parte, en sistemas de fertilización *in vitro* se ha observado, que en ausencia de calcio aunque no se lleva a cabo la penetración de los óvulos libres de la zona pelúcida, por espermatozoides con

reacción acrosomal, si ocurre una unión, no necesariamente la fusión, entre los gametos (23,29,59).

El ión calcio por si mismo es inactivo, para lograr su actividad las células han desarrollado un elaborado sistema de proteínas especializadas en unirse al calcio, para regular la concentración celular del ión y controlar sus efectos (23,27). Una de estas proteínas es la calmodulina o proteína moduladora de calcio y es una de las tres más importantes receptoras de calcio, en función de su concentración en las células (22). La calmodulina es una pequeña proteína (16,790 daltons) ubicua, acidica (pI 3.9-4.3), termoestable cuya secuencia de aminoácidos se ha conservado casi perfectamente a través de la evolución (23,27,28,30).

La calmodulina como proteína receptora de calcio tiene la propiedad de unir 4 iones calcio y formar un complejo, que resulta en un cambio conformacional de la calmodulina. El complejo calcio-calmodulina activa a una gran variedad de enzimas como a las cinasas fosforilasas, varias proteínas cinasas y fosfatasas de proteínas; a la ATPasa-Ca-Mg, adenilato ciclasa, fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos y otras más (30,31). La amplia distribución filogenética de la calmodulina aunado a la diversidad de enzimas reguladas por el complejo calcio-calmodulina, han permitido proponer a esta proteína como el primer modulador de las acciones de las señales del calcio (31).

Ha sido sugerida la participación de la calmodulina

como un factor acoplante de la acción del calcio, en los eventos relativos a la fertilización (reacción acrosomal, fusión de los gametos, etc.).

En el espermatozoide, aislado de una gran variedad de especies (del hombre, conejo, hámster, gallo y erizo de mar (32), se ha determinado la existencia de calmodulina (38,49). Por técnicas inmunocitoquímicas se ha mostrado la presencia de calmodulina, tanto en el flagelo como en la cabeza de dicha célula (32-34,49-51,65) y la mayor cantidad parece estar concentrada en el acrosoma (32); el 99% de la actividad de calmodulina se presentó asociada a la cabeza del espermatozoide del erizo de mar (32).

La calmodulina se localiza en las siguientes regiones espermáticas: en el acrosoma (32,33,49,65), en una banda en la porción posterior del segmento ecuatorial (32,33,50,58) en la punta del flagelo (49) y en la unión de este con la cabeza (49,65). Además, evidencias recientes indican que el espermatozoide tiene localizada calmodulina en la región postacrosomal (34,58). El espermatozoide que ha sufrido la reacción acrosomal, no presenta calmodulina en la región de la cabeza que perdió el acrosoma, las otras regiones del espermatozoide si la conservan, tales como la región posterior del segmento ecuatorial, la región postacrosomal y la pieza media (34,65).

La participación de la calmodulina en la reacción acrosomal, proceso dependiente de calcio, ha sido sugerida por

la inhibición que ocurre, de esta reacción, cuando los espermatozoides son tratados con drogas antagonistas de la calmodulina, como son la trifluoroperazina, W-5 y W-7, (30,35-37,52,60) y por la presencia de calmodulina en el acrosoma. Por otra parte, la localización de calmodulina cerca de la región posterior del segmento ecuatorial y la zona postacrosomal, sitios de reconocimiento del óvulo, sugiere un papel potencial para la calmodulina en la fusión óvulo-espermatozoide (32,34,53,58), proceso dependiente de calcio.

También hay evidencias que establecen la presencia de calmodulina en los óvulos de diferentes especies: de la estrella de mar (40,55), erizo (38,39,54), anfibios (46) y mamíferos (44,45) entre otras (47,56).

En algunos estudios se han valorado los niveles de calmodulina en los óvulos antes, también durante y después (42) de que han sido fertilizados. Así mismo se ha determinado la activación de algunas enzimas con posible función en la maduración del óvulo y en la fertilización. Por ejemplo, la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos (45), la cual se comprobó que en los óvulos del ratón tiene un papel importante en la reanudación de la meiosis. Por otra parte, la NAD cinasa (43), proteína dependiente de calmodulina se mostró que es activada una vez que el óvulo ha sido fertilizado. Ambas enzimas fueron inhibidas por drogas antagonistas de la calmodulina (43,47), en presencia de calcio, lo cual hace pensar su dependencia del complejo calcio-calmodulina. Por

otra parte, se ha demostrado que la calmodulina está presente entre la cara interna de la membrana plasmática y la membrana de los gránulos corticales del óvulo del erizo de mar (41), y se ha determinado que está involucrada en el proceso de exocitosis de los gránulos, confiriéndole a la célula sensibilidad al calcio.

La calmodulina ha sido implicada en la regulación del rompimiento de la vesícula germinal de los óvulos en la profase de la meiosis (54,57). Adicionalmente, la calmodulina ha sido involucrada en el control de la activación de los óvulos del erizo de mar y de los anélidos (54,56,61), al ser fertilizados. En el caso de los óvulos del erizo, la activación del óvulo ha sido valorada por la exocitosis cortical; mientras que en los de los anélidos, el criterio para la activación del óvulo fue el inicio de contracciones ameboideas características (54,61). En adición, también ha sido reportado, en óvulos de los anfibios, que la inyección del complejo calcio-calmodulina libera a los óvulos del bloqueo en la profase I de la meiosis y por tanto se consideró, que en los óvulos de estas especies la calmodulina puede ser el receptor del calcio intracelular, involucrado en la activación del óvulo, en respuesta a la transducción del mensaje hormonal (40,41,44-47,63).

Aunque se ha determinado la presencia de calmodulina en óvulos de diferentes especies y se ha detectado la presencia de CaM en los gránulos corticales de cortezas aisladas de óvulos de erizo de mar, en la actualidad no existe evidencia alguna

que establezca la localización de esta proteína en el gameto femenino intacto, ni durante su interacción y fusión con el espermatozoide, en la fertilización.

De acuerdo a los antecedentes mencionados, se plantearon los siguientes objetivos:

1.- Confirmar la localización, descrita, de la calmodulina en los espermatozoides con reacción acrosomal, y determinar si se mantiene estable.

2.- Establecer si existe calmodulina en la superficie externa del ovocito.

3.- Localizar la calmodulina en el interior del ovocito.

4.- Determinar que efecto produce el bloqueo de la calmodulina tanto del espermatozoide, como de la calmodulina externa del ovocito (si se presentara), o el de la calmodulina en ambos gametos, sobre la capacidad de interacción, fusión y, o en la fertilización.

5.- Describir los cambios en la localización de la calmodulina en ambos gametos, durante la fertilización.

## MATERIALES Y METODOS

## Reactivos

Los reactivos que se utilizaron para la realización de este trabajo fueron de grado analítico y de las siguientes casas comerciales: NaCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, KCl, MgCl<sub>2</sub>, de J.T. Baker de México; acetona, cloroformo y cloruro de amonio, de Merck; Tritón X-100 de BDH Chemical Ltd., USA; piruvato de sodio, ácido láctico, albúmina, sigmacote, aceite de parafina, ácido cítrico, glicerol, paraformaldehído, la hormona gonadotropina coriónica de orina de mujer embarazada, las enzimas: hialuronidasa y tripsina; el inhibidor de tripsina, el reactivo fluorescente de Hoechst 33258, la trifluoroperazina, el EGTA, de Sigma Chemical Co., USA. La hormona gonadotropina coriónica de suero de yegua preñada (Folligon) de los laboratorios Intervet de México.

Los anticuerpos anticalmodulina, las IgGs de suero preinmune de borrego e IgGs de conejo antiborrego, fueron donadas por el biólogo Enrique Hernández y el suero normal de conejo por la Maestra en Ciencias Leticia Moreno Fierros

(producidos en el laboratorio de la doctora Adela Mújica). El anticuerpo de conejo antiborrego acoplado a fluoresceína, fue obtenido de los laboratorios Cappel, USA.

#### Obtención de los espermatozoides

Para la obtención de los espermatozoides se siguió la técnica de Mújica y Valdes-Ruiz (66). Básicamente consiste en: la extracción de los conductos deferentes de cuyos (*cavia sp*) adultos sanos, de un peso mayor de 600 g., los cuales fueron sacrificados por dislocación cervical. A través de una incisión abdominal, se localizaron a los testículos, los cuales se extrajeron unidos al epidídimo y a los conductos deferentes. Del lumen de los conductos deferentes disecados, se vaciaron los espermatozoides mediante la inyección de 2 ml de solución de NaCl (0.154 M) precalentada a 37 C. El producto de cada conducto se recibió en un tubo por separado.

#### Selección de las muestras y lavado de los espermatozoides

Para la selección de las muestras se tomó una pequeña gota, de cada una de las suspensiones celulares y se las observó al microscopio de luz (Carl Zeiss, Mod. Docuval; Germany). Sólo se utilizaron muestras con características adecuadas: con una concentración celular y movilidad buenas;

con escaso porcentaje de espermatozoides inmóviles (muertos) y una baja contaminación (< 1%) de otro tipo celular, en general leucocitos. Para el lavado de los espermatozoides, las muestras seleccionadas se centrifugaron y los paquetes celulares se resuspendieron en NaCl (1 ml de NaCl/paquete celular), se centrifugaron a 2500 rpm durante 4 minutos, el lavado se repitió una vez más.

#### Quantificación de los espermatozoides

En la suspensión celular, para el segundo lavado, las muestras se reunieron y de ella se extrajeron 50 microlitros que se diluyeron con 1 ml de tritón X-100 al 0.1 % (p/v) en PBS (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5.7 mM, NaCl 132 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4.2 mM, pH 7.2). La mezcla se agitó en vórtex por 30 segundos y el conteo celular se realizó en una cámara de Neubauer, para determinar la concentración de espermatozoides.

#### Incubación para la capacitación de los espermatozoides

Los espermatozoides fueron incubados en la solución capacitante, llamada medio mínimo de cultivo modificado (66) MCM-PL (NaCl 105.08 mM, CaCl<sub>2</sub>-2H<sub>2</sub>O 1.75 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25.07 mM, KCl 2.8 mM, piruvato de sodio 0.25 mM, ácido láctico 20 mM, pH 7.8). La incubación se realizó a una concentración de 35 millones de células por mililitro de medio y durante el tiempo

necesario hasta observar espermatozoides con reacción acrosomal, que fue tomada como criterio de la capacitación. Estas muestras con reacción acrosomal fueron utilizadas para la inseminación de los óvulos.

#### Superovulación del hámster

Para la obtención de un gran número de óvulos, se indujo la superovulación por tratamiento hormonal, en hembras vírgenes de hámster de 4 a 5 semanas de nacidas (*Mesocricetus auratus*). El esquema de tratamiento hormonal consistió de una primera inyección subcutánea, de 50 UI de gonadotropina coriónica de suero de yegua preñada (PMSG) para inducir el desarrollo y maduración de un número mayor de folículos y, 56 horas después de la inyección de la primera hormona, se le administró al animal, por la misma vía, 50 UI de gonadotropina coriónica de orina de mujer embarazada (hGC), que induce a la ovulación, a los folículos que alcanzaron la maduración. Entre 20 y 22 horas después de la segunda inyección se sacrificó al animal bajo anestesia con cloroformo.

#### Obtención de los óvulos del hámster

Los óvulos se extrajeron del ampulla del oviducto. Para ello, el animal fue colocado en posición dorsal sobre la mesa y se le practicó una incisión en el músculo cutáneo, a través de

ella se localizaron a los ovarios, que se extrajeron unidos al oviducto y al útero. El explante se limpió del exceso de grasa y se colocó en una caja de Petri que contenía MCM-PLA más K, medio suplementado con albúmina (6 mg./ml de MCM-PL) precalentado a 37 C. En seguida, el explante se colocó en un portaobjetos con medio y se procedió a localizar el ámpula del oviducto bajo el microscopio estereoscópico (Stereo Star ZOOM de AO Scientific Instruments). El ámpula del oviducto se observa como la región más hinchada, irrigada y transparente del oviducto. Con unas agujas se pinchó el ámpula del oviducto para permitir la salida de una masa densa que es expulsada por la presión interna. La masa nebulosa está constituida por los óvulos, rodeados por una gran cantidad de células del cumulus oophorus. Los ovocitos con células del cumulus fueron colectados, con una pipeta Pasteur alargada de punta muy fina, y colocados en una pequeña gota de MCM-PLA más K contenida en un portaobjetos excavado. Previamente las pipetas y los portaobjetos se siliconizaron con Sigmacote y se enjuagaron exhaustivamente.

Cuando los óvulos se utilizaron para la inmunolocalización de la calmodulina, se trabajaron a temperatura ambiente o a 37 C. Para los ensayos de fertilización los ovocitos estuvieron todo el tiempo a 37 C.

### Liberación de los óvulos de sus envolturas

Los óvulos se sometieron a un tratamiento enzimático para liberarlos de las envolturas que los rodean. Primero, se incubaron durante 3 minutos con hialuronidasa al 0.15% (en MCM-PLA más K), enzima que actúa sobre el ácido hialurónico, que une a las células del cumulus, provocando su disgregación. En seguida, los ovocitos con zona pelúcida se transfirieron varias veces (3 ó 4) a gotas consecutivas de MCM-PLA más K, para eliminar los residuos de enzima y las células restantes del cumulus. Cuando se juzgó conveniente, algunos óvulos con zona pelúcida se fijaron en paraformaldehído al 4% en DPBS (NaCl 8.0 g., KCl 0.2 g., KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 g., MgCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O 0.1g., CaCl<sub>2</sub> 0.1 g., Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.15 g., pH 7.4). Los óvulos separados de la primera capa y lavados, se sometieron a un tratamiento con tripsina al 0.1% (en MCM-PLA más K) por aproximadamente 1 minuto, para disolver a la zona pelúcida. Durante este tratamiento las células se observaron continuamente, e inmediatamente después de que la zona pelúcida se disolvió, fueron transferidos a una nueva gota de MCM-PLA más K, que contenía inhibidor de tripsina al 0.1% en MCM-PLA.

Los óvulos libres de sus envolturas se transfirieron 5 veces consecutivas a MCM-PLA más K limpio, para eliminar a la tripsina y, al inhibidor de tripsina.

En algunos experimentos los óvulos fueron liberados de

la zona pelúcida mecánicamente, con la ayuda de una pipeta Pasteur alargada, cuyo diámetro (aprox. 100 micras), era menor al del óvulo con zona pelúcida.

#### Fertilización heteróloga *in vitro*

Para la preparación de espermatozoides con reacción acrosomal, las células se incubaron en el medio MCM-PL, suplementado con potasio (2.8 mM) hasta que en la suspensión se observaron, al microscopio de luz, espermatozoides carentes de acrosoma y con movimiento hiperactivado, en un 10% de la población total. En seguida, se tomaron 10 microlitros de la suspensión de espermatozoides y se adicionaron a los óvulos sin zona pelúcida, mantenidos en MCM-PLA más K, bajo aceite de parafina, a 37 C en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>-aire, en una incubadora (Imperial II, Lab-line Inc. Ill.). Los óvulos inseminados se regresaron a la incubadora, donde se mantuvieron por los periodos de tiempo seleccionados (15 minutos, 2,3,4 y 17 horas). Excepto en las interacciones de 15 min, una hora después de iniciada la inseminación, los óvulos se lavaron 3 veces en MCM-PLA más K, para eliminar el exceso de espermatozoides y a aquéllos que no se hubieran unido fuertemente y se continuó la incubación. Al término de ésta, los óvulos se lavaron nuevamente 3 ó 4 veces en MCM-PLA más K, antes de ser observados.

## Valoración de la fertilización heteróloga

La valoración en óvulos vivos. La fertilización en éstos se determinó por microscopia de contraste de fases (Zeiss universal) utilizando un objetivo 40X. La fertilización se consideró positiva cuando en el citoplasma del gameto femenino se observaron núcleos espermáticos.

La valoración en óvulos fijados. En los óvulos fijados la fertilización se determinó mediante su tinción con el reactivo de Hoechst 33258, fluorocromo que reacciona específicamente con el DNA nuclear.

Para la tinción, las células fijadas en paraformaldehído (4%) en DPBS, se lavaron y permeabilizaron como se describirá para la inmunotinción de calmodulina. Los óvulos permeabilizados se incubaron en 50 microlitros del reactivo de Hoechst (1-10 microgramos de Hoechst/ml de DPBS) durante 10 min, en atmósfera húmeda a temperatura ambiente. Al término de la incubación los gametos se lavaron exhaustivamente, en agua bidestilada, por transferencia a varias gotas sucesivas.

Para la valoración de la fertilización, las células se depositaron en un portaobjetos, que contenía 15 microlitros de una solución de citrato-fosfato (ácido cítrico 0.1 M y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.2 M, pH 5.5). La observación se realizó en un microscopio Zeiss universal equipado con iluminación de epifluorescencia.

El reactivo de Hoechst fluoresce a 365 nm, se utilizó un filtro de excitación ultravioleta. Los óvulos fertilizados mostraban núcleos espermáticos brillantes intactos o en descondensación. Las fotografías se tomaron utilizando una película Tri X-pan ASA 400.

#### Tratamiento de los gametos con trifluoroperazina ( TFP )

Los espermatozoides se obtuvieron y capacitaron, siguiendo la metodología anteriormente descrita y los óvulos fueron liberados de la zona pelúcida con tripsina. Previo a la mezcla de los gametos, para su interacción, éstos se preincubaron por separado en MCM-PLA más K, adicionado de trifluoroperazina (1 ó 10 micromolar, concentraciones finales), a 37 C durante 10 min. En seguida, las células sin lavar se mezclaron, diez microlitros de la suspensión de espermatozoides se adicionaron a los óvulos. Los óvulos inseminados se incubaron, bajo las condiciones ya descritas, durante 15 - 17 horas. Al final de la incubación, los huevos se lavaron por transferencia a MCM-PLA más K, y se observaron en el microscopio de contraste de fases, para hacer la valoración de la fertilización. Un control, de gametos sin tratamiento, fue corrido paralelamente, con cada experimento.

Tratamiento de los óvulos con anticuerpos anticalmodulina o con inmunoglobulinas G de suero de borrego, no inmune

Los óvulos se incubaron a 37 C durante 60 minutos en el medio MCM-PLA más K, que contenía: a) los anticuerpos anticalmodulina diluidos 1:4 en el medio MCM-PLA más K, b) las IgGs de suero de borrego no inmune (diluidas 1:10 en PBS) en 40 microlitros de MCM-PLA más K, y c) en el medio MCM-PLA más K, sin ninguna adición.

Para la inseminación, cada lote diferente de óvulos fue añadido de 10 microlitros de la suspensión de espermatozoides con reacción acrosomal y la incubación se continuó durante 15-17 horas, bajo las condiciones anteriormente descritas. La valoración de la fertilización se realizó por microscopía de contraste de fases.

Tratamiento de los gametos con EGTA

Espermatozoides capacitados y con reacción acrosomal y óvulos carentes de zona pelúcida, por tratamiento con tripsina, fueron tratados por separado con 17 mM de EGTA, durante 10 minutos y luego mezclados para que interaccionaran. La mezcla de gametos se incubó durante 2 ó 3 horas, bajo las condiciones ya mencionadas. Al término de la incubación, las células se lavaron por transferencia a MCM-PLA más K (cuatro veces). En

ellas se valoró la fertilización por microscopia de contraste de fases.

#### Inmunolocalización de la calmodulina en los gametos

Para localizar la calmodulina en los gametos se utilizó la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI). Como primer anticuerpo, se usó un anticuerpo policlonal anticalmodulina, producido en borrego por inmunización con calmodulina purificada de testículo de bovino. Como segundo anticuerpo se utilizaron IgGs de conejo antiborrego, acopladas a fluoresceína.

#### Detección de la calmodulina (IFI) en los espermatozoides

A diferentes tiempos de iniciada la incubación en el medio MCM-PL, se tomaron muestras alicuotas (0.3 ml) de la suspensión de espermatozoides y se fijaron (mínimo 1 hora), por la adición de 0.6 ml de paraformaldehído al 4% en DPBS. Como control de espermatozoides no capacitados, también se fijó una alicuota de 0.3 ml de células suspendidas en NaCl inmediatamente después de la obtención de los gametos. Después de la fijación, las células fueron sometidas a 4 lavados por centrifugación 2500 rpm durante 4 minutos. Los residuos de paraformaldehído se neutralizaron por tratamiento de las

células (10 min), en una solución de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.05 M en DPBS. Los gametos se lavaron nuevamente en DPBS, 3-4 veces, como se indicó. Para la permeabilización, el paquete de espermatozoides se resuspendió en acetona fría (-20 C) durante 7 minutos, incluida la centrifugación. La acetona se desechó y los paquetes celulares se lavaron en DPBS, 3 veces. Después del último lavado, cada muestra fue tratada por 1 hora en una solución de albúmina sérica bovina, fracción V (1 mg /ml de DPBS), a 37 C, para bloquear los sitios antigénicos inespecíficos. La muestra se centrifugó, se desechó el sobrenadante y las células sin lavar fueron tratadas con el anticuerpo anticalmodulina, durante una hora a 37 C, o toda la noche a 4 C. El anticuerpo se añadió diluido 1:4 en DPBS. Las células se lavaron, 3-4 veces por centrifugación. Los paquetes celulares fueron incubados por 1 hora a 37 C con el segundo anticuerpo, diluido 1:5 en DPBS, por 1 hora a 37 C. Las muestras se centrifugaron, el sobrenadante fue desechado y las células se lavaron 3-4 veces en DPBS. Las pastillas se resuspendieron en 0.1 ml de agua bidestilada. De esta suspensión se tomaron 10 microlitros y se colocaron sobre un portaobjetos que contenía 15 microlitros de una solución de glicerol-PBS (9:1) pH 8.5. Sobre la gota se colocó un cubreobjetos y se sellaron sus extremos con barniz transparente.

Los controles se hicieron omitiendo, del tratamiento, la incubación con el anticuerpo anticalmodulina.

Las células se examinaron en un microscopio Zeiss equipado con iluminación de epifluorescencia.

#### Detección de la calmodulina (IFI) en los óvulos

La inmunodetección de calmodulina se realizó en óvulos sin zona pelúcida así como en óvulos a los que no les fue retirada la zona. Algunas muestras se fijaron, otras se fijaron y permeabilizaron y otras, sin fijación, fueron inmunotestadas, es decir óvulos vivos. Las células se manejaron en suspensión, en pequeños volúmenes de solución contenida en la excavación de un portaobjetos.

Los óvulos se fijaron por tratamiento en paraformaldehído al 4% en DPBS, durante 12 horas mínimo. Las muestras fijadas fueron sometidas a 4 lavados en DPBS, filtrado por Millipore. El lavado del fijador se efectuó por transferencias sucesivas de los óvulos, mediante una pipeta Pasteur de punta alargada. El paraformaldehído residual se neutralizó, por tratamiento, durante 10 min con una solución de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.05 M en DPBS. En seguida, los gametos se lavaron 3 veces en la solución de DPBS. Todo el tratamiento anterior se omitió cuando los óvulos no fueron fijados. Para la permeabilización de los óvulos, éstos fueron tratados durante 7 minutos exactos con acetona fría, a  $-20^\circ\text{C}$ . De inmediato los óvulos se lavaron 3 veces en DPBS. Previamente a la inmunotinción, todas las preparaciones recibieron el tratamiento para el

bloqueo de determinantes antigénicos inespecíficos. Para ello, los óvulos se transfirieron a DPBS con albúmina (1 mg/ml de DPBS) y se incubaron por 1 hora a 37 C, en cámara húmeda. Para la inmunotinción, los óvulos después del tratamiento con la albúmina, sin lavar fueron transferidos a otro portaobjetos, que contenía al anticuerpo anticalmodulina (diluido en 3 volúmenes de DPBS, y se dejaron interaccionar por 1 hora a 37 C o por 15 horas a 4 C, en cámara húmeda. Las células se lavaron 3 veces en DPBS. Se les añadió el segundo anticuerpo diluido 1:5 en DPBS, y se incubaron 1 hora a 37 C, en cámara húmeda. Las células se lavaron 4 veces en DPBS y se montaron entre porta y cubre suspendidos en 15 microlitros de glicerol.

Los controles se hicieron omitiendo, del tratamiento, la incubación con el anticuerpo anticalmodulina.

Las células se examinaron en un microscopio Zeiss equipado con iluminación de epifluorescencia.

En seguida se señalan algunas diferencias en el proceso de detección por IFI de CaM en los óvulos vivos (células que no se fijaron ni se permeabilizaron): 1) se utilizó MCM-PLA más K en lugar del DPBS, 2) un control adicional fue incluido, en el cual el anticuerpo anticalmodulina fue substituido por IgGs de suero de borrego preimmune (1:10), y 3) las muestras se observaron sin cubreobjetos. Quince horas después de la inmunotinción se realizó la observación de estas células, durante este tiempo, las células se mantuvieron a 4 C.

## RESULTADOS

El bloqueo de sitios antigénicos no específicos para el anticuerpo anticalmodulina

En la detección de calmodulina en los óvulos por la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI), el control obligado, la tinción sólo con el segundo anticuerpo acoplado a fluoresceína, dió positivo (Fig. 1a).

Para evitar la unión inespecífica del segundo anticuerpo se ensayaron 3 tratamientos de bloqueo. Tanto el bloqueo con albúmina sérica de bovino, o con suero normal de conejo, así como con IgGs de conejo anti IgGs de borrego, evitó la fluorescencia inespecífica en las muestras, al ser tratadas con sólo el segundo anticuerpo (Fig. 1b). En los experimentos que se describen a continuación utilizamos la albúmina, para el bloqueo. Su selección fue en razón de su capacidad para bloquear y su accesibilidad.

Para la inmunolocalización de la calmodulina en los espermatozoides del cuyo, también se encontró la albúmina apropiada para el bloqueo de los sitios inespecíficos.

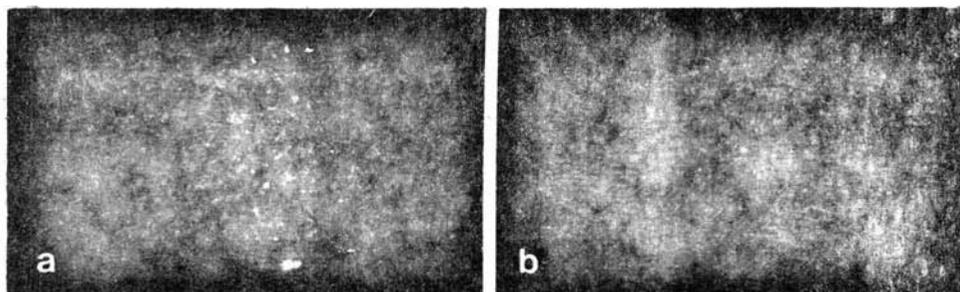


Fig. 1. Bloqueo de sitios antigénicos no específicos para el anticuerpo anticalmodulina. a) Ovulo no fertilizado teñido por IFI, en el proceso se omitió el bloqueo y el tratamiento con el primer anticuerpo (IgGs antiCaM) y sólo fue tratado con el segundo anticuerpo (acoplado a fluoresceína), b) Los óvulos fueron bloqueados con albúmina como se indica en Métodos y teñidos por IFI con sólo el segundo anticuerpo.

## Localización de la calmodulina en los óvulos sin zona pelúcida, o desnudos

A los óvulos que fueron liberados de la zona pelúcida (ZP) por tratamiento enzimático, se les denominará óvulos DTrip y a los que lo fueron por tratamiento mecánico, de aquí en adelante los referiremos como óvulos DMec. Previo a la inmunotinción de ambos grupos de óvulos, éstos fueron fijados, permeabilizados y bloqueados con albúmina (véase Métodos).

A) Preparaciones de óvulos (DTrip). Notamos que la cantidad de calmodulina y su distribución era dependiente del tamaño del óvulo.

Los óvulos pequeños, de 67 a 84 micras de diámetro, mostraron fluorescencia tenue difusa y en algunas regiones más localizada, como parches (Fig. 2a y b).

Los óvulos con un diámetro intermedio, de 92 a 100 micras, mostraron un alto contenido de calmodulina (Fig 2c-f), la fluorescencia fue intensa en toda la célula. Se la detectó concentrada bordeando la región en la que se liberó el primer cuerpo polar (Fig. 2c) El cuerpo polar mismo mostró la mayor fluorescencia (Fig. 2d). Además, se observó un entramado rugoso desorganizado cuya localización específica (intra o extracelular) no pudo ser definida (Fig. 2e). Por otra parte también se presentaron regiones, en los óvulos, en las que la concentración de calmodulina era menor (Fig. 2f). En algunas

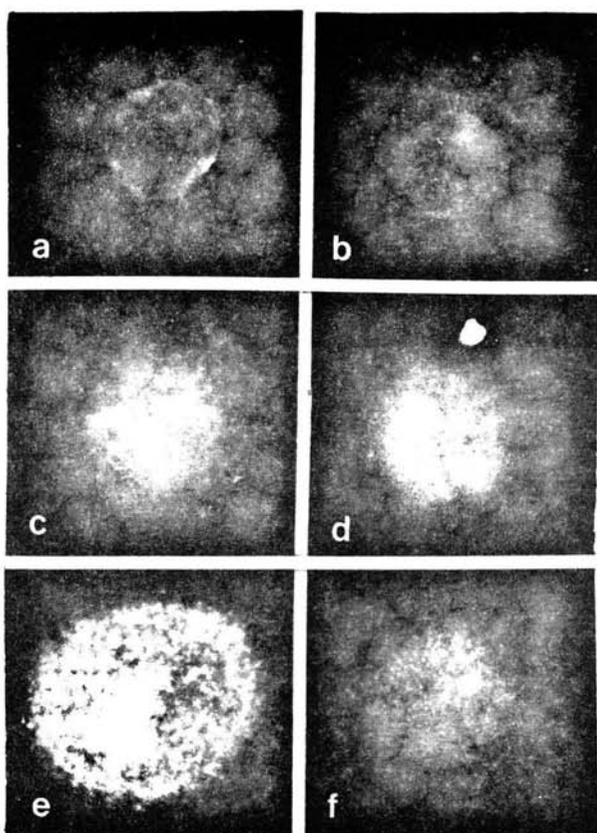


Fig. 2. Distribución de calmodulina en óvulos no fertilizados, liberados de la zona pelúcida con tripsina. La CaM se detectó por IFI. a) y b) Óvulos de diámetro pequeño (67-84 micras) muestran poca calmodulina y una distribución difusa de la misma. c) a f) Óvulos de diámetro intermedio (92-100 micras). La concentración de CaM en éstos es mayor, la fluorescencia es intensa en toda la célula. c) La flecha señala el sitio de liberación del cuerpo polar, donde CaM se observa concentrada bordeando la región. d) La flecha señala al cuerpo polar. e) y f) Estos óvulos muestran a la CaM distribuida formando un entramado con puntos finos y gruesos.

células, la calmodulina se observó en forma de punteado, tanto fino como grueso (Fig. 2e). El número de células examinadas fue de 215.

B) Preparaciones de óvulos (DMec). Sólo se tiene registro de óvulos cuyo diámetro iba de 100 a 142 micras. Estas células mostraron un menor contenido de calmodulina, fluorescencia menos intensa y más estructurada (Fig. 3a-c), que la mostrada por los óvulos DTriip de diámetro similar. Sin embargo, la fluorescencia en la periferia fue más intensa en los óvulos liberados de la zona pelúcida de manera mecánica. La fluorescencia bordeaba la periferia de la célula como un punteado grueso, que producía a tramos una fluorescencia continua (Fig. 3a y b). Es importante mencionar que no todos los óvulos DMec presentaron fluorescencia en el cuerpo polar (Fig. 3a), en otros fue aparente (Fig. 3b). El sitio de liberación del primer cuerpo polar también mostró fluorescencia intensa (Fig. 3c). Igual que en los óvulos DTriip se presentaron regiones en las cuales la fluorescencia era menor (Fig. 3 a y c). El número de células examinadas fue de 77.

Localización de la calmodulina en óvulos sin zona pelúcida no permeabilizados

Debido a que los óvulos sin ZP (DTriip y DMec) mostraron fluorescencia localizada en la periferia, decidimos investigar si la calmodulina revelada era un componente externo del óvulo.

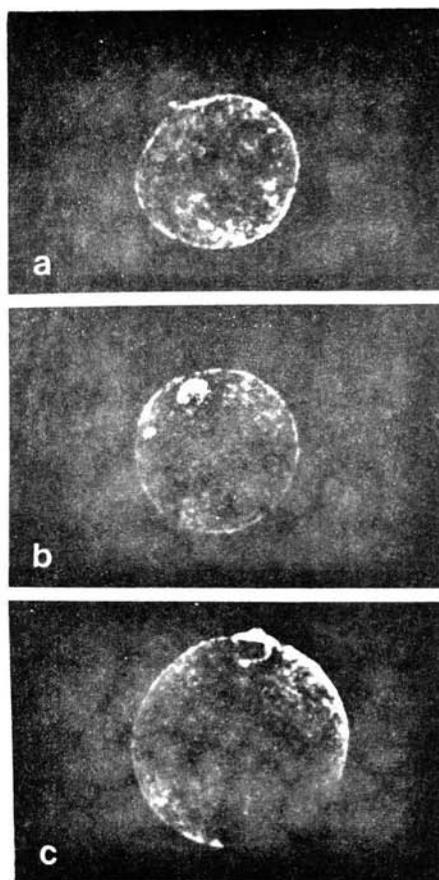


Fig. 3. Distribución de la calmodulina en óvulos no fertilizados, liberados de la zona pelúcida de manera mecánica. La CaM se detectó por IFI. a), b) y c) Óvulos de diámetro grande (100-142 micras), en estas preparaciones (DMec) la fluorescencia en los óvulos, fue menos intensa, más estructurada y más aparente una fluorescencia bordeando a las células, comparada con la presentada por los óvulos DTrip (Fig. 2). Nótese la fluorescencia intensa en el cuerpo polar (b) y a la CaM bordeando la región donde se liberó el cuerpo polar (c).

Para ello, los óvulos se fijaron, pero se omitió la permeabilización de los mismos, para impedir la entrada del anticuerpo a la célula y asegurar que sólo reaccionara con la superficie externa. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.

Los óvulos DTriP no permeabilizados, mostraron a la calmodulina distribuida de manera muy similar (Fig. 4 a y b), a la observada en los células DTriP permeabilizadas (Fig. 2 a-f). Así, las preparaciones DTriP no permeabilizadas mostraron fluorescencia intensa y difusa, así mismo regiones con menor fluorescencia. El sitio de liberación del primer cuerpo polar con fluorescencia alrededor del mismo (Fig. 4a y b). También los óvulos DTriP no permeabilizados presentaron un entramado aunque en ellos el punteado fue menos aparente, que en los óvulos permeabilizados. El número de óvulos observados fue de 45.

En las preparaciones de óvulos DMec, no permeabilizados, la distribución de calmodulina fue diferente a la observada en los óvulos DMec permeabilizados. El halo periférico de calmodulina fue muy intenso y continuo, en ocasiones se presentó tan intenso o más que en las células permeabilizadas (Fig. 4c). Cuando algunas células fueron observadas a mayor profundidad focal, se pudo distinguir un entramado pálido y difuso, aparentemente intracelular (Fig. 4d) y diferente al mostrado por las células permeabilizadas. Los óvulos observados fueron 38.

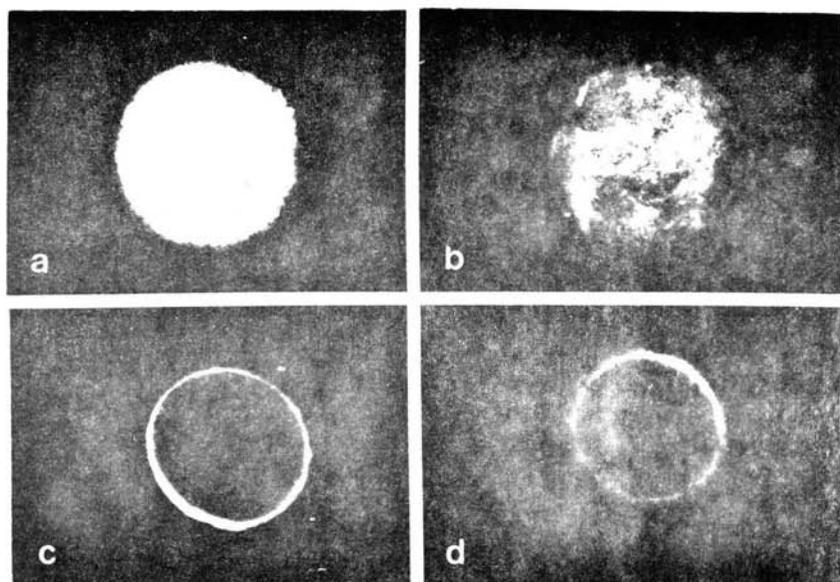


Fig. 4. Distribución de la calmodulina en óvulos no fertilizados, en los que se omitió la permeabilización. La tinción de CaM (IFI) se realizó en óvulos en los que la zona pelúcida se disolvió con tripsina a) y b) y en otros que fueron desnudados mecánicamente c) y d). En a) y b) los óvulos muestran fluorescencia intensa y su distribución es similar a la presentada por los óvulos permeabilizados (Fig. 2c-f). En c) y d) se muestra el mismo óvulo teñido para calmodulina, a dos planos focales; nótese la fluorescencia intensa que bordea a la célula, formando un halo periférico.

Cuando se compararon los óvulos DTrip sin permeabilizar contra los óvulos DMec también sin permeabilizar, los primeros en general, mostraron una distribución más difusa de la calmodulina y una mayor fluorescencia. Esta comparación se hizo en óvulos cuyo tamaño promedio fue de 100 micras.

#### Detección de la calmodulina en óvulos vivos

La fluorescencia observada en los óvulos sin permeabilizar, podría atribuirse a la entrada de algo del anticuerpo a la célula, por posibles orificios producidos por la acción del fijador. O bien, a la presencia de calmodulina en la superficie externa del óvulo. Otra forma de abordar el problema consistió, en la inmunotinción de los óvulos (DTrip y DMec) *in vivo* y como control se incluyó el tratamiento de los óvulos con IgGs de suero normal de borrego en lugar del anticuerpo anticalmodulina.

En general, los óvulos (DTrip) teñidos *in vivo* mostraron fluorescencia tenue (Fig. 5a-d) alrededor de la célula formando el halo. La mayoría de estos óvulos no mostraron entramado, cuando éste se llegó a observar su localización parecería ser externa (Fig. 5b)

Los óvulos (DMec) teñidos *in vivo* también mostraron el halo fluorescente, más intenso que los desnudados con tripsina (Fig. 5e y f).

En estos óvulos teñidos *in vivo*, el sitio de liberación

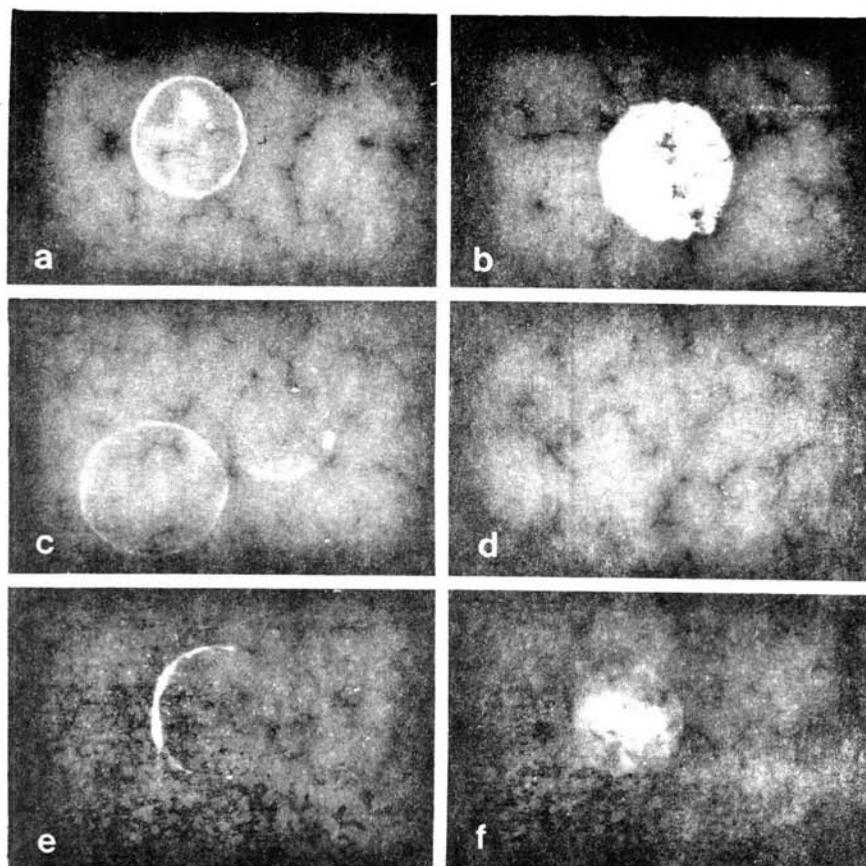


Fig. 5. Detección de la calmodulina en óvulos vivos. En a), b), c) y d) óvulos liberados de la zona pelúcida por tratamiento con tripsina. En e) y f) a los óvulos se les retiró la zona pelúcida de manera mecánica. Todos los óvulos teñidos *in vivo* para CaM mostraron fluorescencia muy tenue formando un halo periférico.

del primer cuerpo polar no pudo ser reconocido, ya que no se presentó calmodulina concentrada alrededor de una zona definida

La tinción *in vivo* dió fluorescencia menos intensa (Fig. 5a-f), que la tinción en óvulos fijados y no permeabilizados (Fig. 4a-d).

Es muy importante hacer notar que la fluorescencia, de las células teñidas *in vivo*, se disipaba en cuestión de minutos, de manera tal, que se había extinguido después de que la célula fue fotografiada (exposición de 1.5 min). Por otra parte, se observó que por el marcaje *in vivo* con los anticuerpos (anticalmulina y segundo anticuerpo), un porcentaje bajo (10%) de las células sufrió hinchamiento, y no recuperaron su tamaño normal (Fig. 5d).

En la preparación control, en la que el anticuerpo anticalmulina fue substituido por IgGs inespecíficas, la adición del segundo anticuerpo no produjo fluorescencia (Fig. 7a y b). Esto indica que las IgGs normales no reconocieron ningún sitio antigénico sobre el óvulo, ni en su interior, si es que penetraron. Sin embargo, las IgGs de suero normal de borrego provocaron el hinchamiento y la destrucción de un porcentaje alto (80%) de óvulos.

### Detección de calmodulina en la zona pelúcida

Debido a que los óvulos teñidos *in vivo* también mostraron reacción con el anticuerpo anticalmodulina (IFI), quisimos conocer si en la ZP podría distinguirse algo de la calmodulina del óvulo, si en éste fuera externa. Para ello, la inmunotinción se realizó en tres tipos de preparaciones de óvulos: a) fijados y permeabilizados, b) fijados y no permeabilizados y c) en células vivas.

La fijación, a los gametos con ZP (grupos a y b) les produjo algún tipo de alteración. Las células se adherían fuertemente a la superficie del portaobjetos y en algunos casos el óvulo era desprendido de su ZP, al ser transferido mediante succión suave. Durante la permeabilización (óvulos del grupo a), la ZP fue disuelta en la mayoría de las células tratadas.

Por inmunotinción, las preparaciones con ZP fijadas, permeabilizadas (Fig. 6a) o sin permeabilizar (Fig. 6b y c) mostraron una muy intensa fluorescencia. Esta era aparente tanto en el óvulo como en su ZP, como se observa en la Fig. 6c, donde el óvulo fue roto, a propósito, por presión entre las laminillas

Para la inmunotinción *in vivo* de los óvulos con ZP (grupo c), se utilizaron IgGs anticalmodulina, y en el control éstas se substituyeron por IgGs de suero normal de borrego.

La técnica de IFI en los óvulos vivos, utilizando

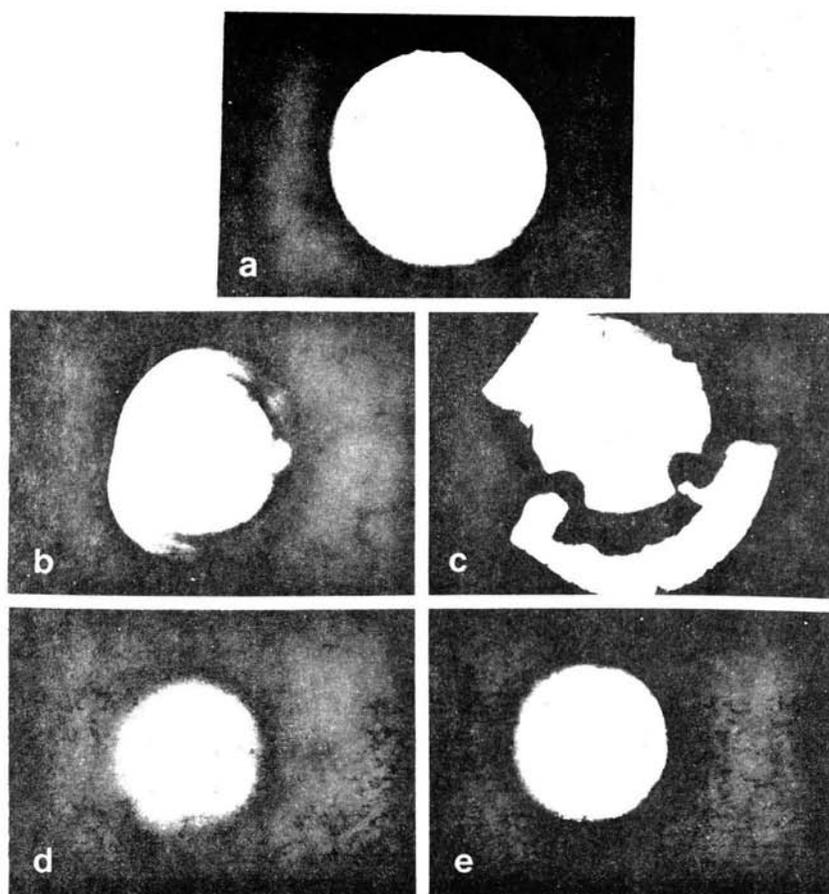


Fig. 6. Detección de la calmodulina en la zona pelúcida. La tinción de CaM (IFI) se realizó en óvulos en los que la zona pelúcida no fue eliminada. En a) un óvulo fijado y permeabilizado. En b) y c) óvulos fijados en los que se omitió la permeabilización. En d) y e) ovulos teñidos para CaM *in vivo*. Los óvulos fijados y permeabilizados (a) o los fijados y no permeabilizados (b y c) mostraron fluorescencia muy intensa tanto en la ZP como en el óvulo mismo. En b) y c) se muestra el mismo óvulo, en c) el óvulo fue roto a propósito. En los óvulos teñidos *in vivo* (d y e), la zona pelúcida mostró fluorescencia muy tenue, pero en el óvulo fue muy intensa.

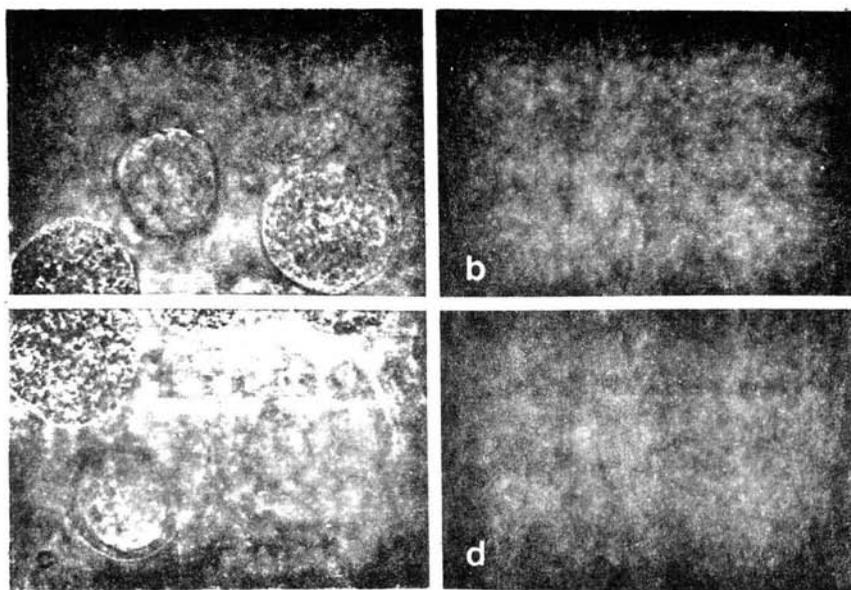


Fig. 7. Substitución de las IgGs anticalmodulina por las IgGs normales durante el tratamiento *in\_vivo* de los óvulos por IFI. La tinción se realizó en óvulos no fertilizados liberados de la zona pelúcida con tripsina, (a y b), o bien, en óvulos a los que no se les eliminó dicha región, (c y d). En a) y c) microscopía de contraste de fases; en b) y d) microscopía de fluorescencia. El tratamiento de los óvulos con IgGs normales no produjo fluorescencia.

anticalmodulina como primer anticuerpo dio resultados muy diferentes, a los obtenidos en los óvulos fijados. La ZP presentó una fluorescencia muy tenue (Fig. 6d y e) que podría ser el reflejo de la mostrada por el óvulo. Este, se observó intensamente fluorescente, al igual que en las preparaciones con ZP, fijadas (Fig. 6a-c). La inmunotinción bajo estas condiciones causó hinchamiento, tanto del óvulo como de la ZP. En la Fig. 6d, el óvulo está hinchado y cancela el espacio perivitelino. La Fig. 6e muestra un óvulo en el que la ZP está distendida en un región.

La tinción por IFI de los óvulos control, los tratados con IgGs inespecíficas como primer anticuerpo, no produjo fluorescencia en las células. Ni en el ovocito ni en la zona pelúcida (Fig. 7c y d). La incubación con las IgGs normales causó en los óvulos con ZP un mayor hinchamiento (Fig. 7c), que el producido por el anticuerpo anticalmodulina (Figs. 6d y e). Los óvulos no se rompieron, pero no recuperaron su tamaño normal (Fig. 7c y d).

Localización de la calmodulina en los espermatozoides durante su capacitación y reacción acrosomal

Hemos señalado como uno de los objetivos de este estudio, el conocer la participación de la CaM en la fertilización, proceso dependiente de calcio. Si la CaM está implicada en el proceso, sería de esperarse su presencia en las

regiones del espermatozoide, que son reconocidas por el óvulo, durante la fusión de los gametos. En el trabajo realizado en el mismo laboratorio, Mújica y Trejo (34) observaron la presencia transitoria de CaM en la región ecuatorial, y en los espermatozoides con reacción acrosomal la CaM fue observada en la zona postacrosomal, cuando la RA fue producida de manera sincrónica, por diferentes tratamientos. Aquí la capacitación de los espermatozoides se realizó por incubación en el medio mínimo de cultivo (MCM). En este medio la presentación de la reacción acrosomal es gradual, conforme se van capacitando los espermatozoides pierden su acrosoma y se alcanza el porcentaje máximo de reacción acrosomal a las 2-3 horas de iniciada la incubación (25).

Para localizar a la CaM en los espermatozoides, fueron fijadas muestras a lo largo de la incubación y la CaM fue revelada por IFI. Los patrones de distribución de la CaM aquí observados se comparan con los comunicados por Mújica y Trejo (Tabla 1). La CaM se presentó: 1) en el acrosoma aparentemente intacto, también cuando éste se observó contraído (Fig. 1a y c respectivamente, 2) en la región postacrosomal, de espermatozoides con acrosoma no totalmente estructurado (Fig. 1b) o sin acrosoma (Fig. 1e y f), 3) en la región del núcleo donde previamente se encontraba el acrosoma, en general como fluorescencia pálida (Fig. 1e-g) y en algunos de éstos se distinguía un anillo, situado probablemente en la región ecuatorial (Fig. 1d,e y g). La CaM estuvo presente en el

**Tabla 1. Patrones de la inmunolocalización de la calmodulina % en los espermatozoides del cuyo durante su capacitación y reacción acrosomal**

Tiempo de incubación en MCM (min)	a	b	c	d	e	f	g
Control *	90.8	0.65	0.97	—	0.97	3.6	3.0
1-3	84.6	—	—	—	1.9	8.6	4.6
15	84.0	6.9	—	—	2.4	—	6.7
30	75.5	6.5	—	—	5.0	5.5	6.1
135	6.9	27.9	—	—	46.7	8.1	10.1
150	14.4	16.9	—	1.6	55.7	3.2	5.5

\* Control: Espermatozoides no capacitados suspendidos en NaCl

Tabla 1. Para permitir la capacitación y expresión gradual de la reacción acrosomal de los espermatozoides, éstos se mantuvieron en incubación en el medio MCM, se tomaron muestras alícuotas de 0.3 ml, se fijaron en paraformaldehído al 4% en DPBS para su tratamiento por IFI.

flagelo de todas las células, independientemente del patrón que mostraran en la cabeza. En el flagelo, la región que mostró mayor concentración de CaM fue la pieza media (Fig. 1a-f).

En los espermatozoides no capacitados (control) suspendidos en solución de NaCl (véase Métodos), el 91% de las células presentó CaM en el acrosoma, aparentemente intacto, y en el flagelo. El 9% de las células restantes mostraron diferentes patrones, ver figuras de la Tabla 1. Las células cuantificadas fueron 307.

A los pocos minutos (1-3) de iniciada la incubación en el medio capacitante, los espermatozoides conservaban patrones de distribución de CaM similares a los mostrados por los gametos no capacitados.

Después de 15 minutos (ó 30 min) de iniciada la incubación, un 23% de las células mostraban fluorescencia en la región postacrosomal (Fig. 1b, e-g). Para los tiempos señalados se contaron 212 y 132 espermatozoides, respectivamente.

La suspensión de células que se mantuvieron en incubación durante 135 y 150 min presentaron un elevado número de espermatozoides con reacción acrosomal. El patrón de los espermatozoides con RA se caracterizó por presentar fluorescencia sobre el núcleo, en su parte media inferior (Fig. 1e). Este patrón fue observado en un 46.7% y 55.7% para los tiempos señalados, respectivamente. La diferencia en los porcentajes dados en la Tabla 1, con respecto al 100%,

correspondió a otros patrones no mostrados, tales como: en espermatozoides sin acrosoma, fluorescencia difusa en todo el núcleo, o con fluorescencia en la región que correspondió al acrosoma y con un anillo en la región ecuatorial, etc., el porcentaje de éstos fue bajo. Las células valoradas fueron 197 y 124 para las muestras incubadas 135 y 150 min., respectivamente.

#### Fertilización heteróloga *in vitro*

Hasta aquí hemos descrito la localización de la calmodulina en ambos gametos. Se hizo énfasis principalmente en los datos relativos al óvulo, ya que en la literatura no existe ninguna comunicación. Del espermatozoide, nos interesaba corroborar la presencia de calmodulina en los sitios que reconocen al óvulo, según lo encontrado por Trejo & Mújica (34) y Camatini (50). Nuestro interés en conocer la localización de la calmodulina, en ambos gametos durante su interacción, nos llevó a adaptar un método de fertilización heteróloga (6), a las condiciones de nuestro laboratorio.

La incubación de los gametos durante 2 horas, en el medio MCM-PLA suplementado con 2.8 mM de KCl (véase Métodos), ya fue un tiempo suficiente para reconocer que la fertilización se había efectuado. El porcentaje de óvulos penetrados se incrementó con el tiempo, a las 17 horas de iniciada la interacción fue de 80 a 90%. La fertilización de los óvulos

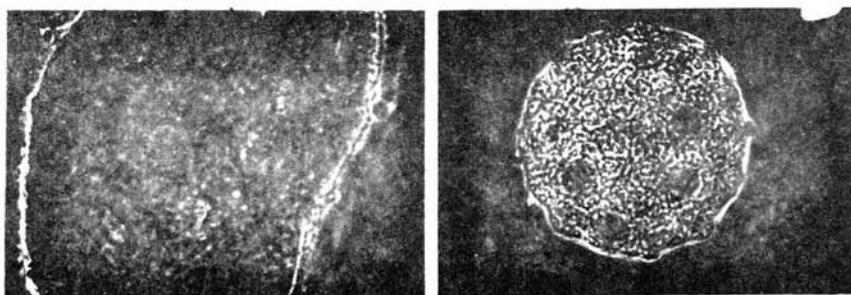


Fig. 8. Fertilización heteróloga in vitro. La co-incubación se realizó con óvulos desnudos del hámster y espermatozoides del cuyo con reacción acrosomal en el medio MCM suplementado con potasio y albúmina. a) Ovulo fertilizado 17 horas postinseminación. Nótese la presencia de 2 pronúcleos acercándose al centro del óvulo. b) Ovulo polispérmico de 17 horas postinseminación.

fue independiente del procedimiento empleado para quitarles la zona pelúcida. Además, todos los óvulos fertilizados presentaron polispermia y ésta fue mayor con el aumento en el tiempo de interacción.

La valoración de la fertilización de los óvulos, que se dejaron interaccionar 17 horas, se realizó principalmente por microscopia de contraste de fases. Esta técnica se aplicó ocasionalmente para determinar la fertilización en los óvulos con un menor tiempo de interacción. En la Fig. 8a se muestra un óvulo de 17 horas de fertilización, en él se pueden observar dos pronúcleos acercándose al centro del óvulo, y en la Fig. 8b se muestra un óvulo polispermico.

Durante la fertilización un porcentaje alto (50%) de los óvulos se dañaron, cuando la interacción de los gametos se realizó por 17 horas. Fue aparente que unos sufrieron hinchamiento y otros se rompieron, porque el número recuperado era menor. En el manejo de los óvulos fertilizados, durante la fijación y en la permeabilización se presentaron las mismas dificultades ya descritas para los óvulos no fertilizados.

Visualización de la fertilización con el reactivo Hoechst 33258

Óvulos no fertilizados (control). Los óvulos desnudos del hámster, que tienen a los cromosomas en metafase II de la meiosis, presentaron el paquete cromosomal fluorescente muy

cercano a la periferia, por debajo del sitio en que fue liberado el primer cuerpo polar (Fig. 9a) como ha sido previamente descrito (26). El fluorocromo reaccionó específicamente con el DNA sin mostrar unión en ninguna otra región de la célula .

#### Ovulos inseminados:

A) Los óvulos mantenidos en interacción con los espermatozoides durante 15 minutos, nos permitieron hacer la comparación entre la cromatina del óvulo y la perteneciente a los espermatozoides. Así, en la Fig. 9b, que corresponde a este tiempo de incubación, se observan numerosos espermatozoides, varios de ellos con reacción acrosomal, interaccionando con la membrana plasmática del óvulo, las cabezas se observan condensadas fluorescentes, y el núcleo del óvulo más fluorescente y de mayor tamaño.

B) En las células fijadas después de 2 horas de interacción, se pudo observar el inicio de la descondensación de la cromatina de los espermatozoides internalizados. En general, eran muchos los espermatozoides que se adherían al óvulo (Fig. 9c). Sin embargo, es posible distinguir a aquéllos que empiezan a ser descondensados, ya que su fluorescencia abarcaba una zona más amplia. Mientras que la cromatina del óvulo ya no podía ser diferenciada de la que correspondía a un núcleo espermático en descondensación.

C) Cuando los gametos fueron incubados por un periodo de tiempo más prolongado (3 horas) (Fig. 9d), la fluorescencia de los núcleos espermáticos internalizados fue menos intensa y más difusa, que la observada en ellos a las 2 horas de interacción. En estos óvulos la polispermia era mayor que en los fijados a las 2 horas.

D) En los gametos co-incubados por 4 horas la descondensación de la cromatina espermática todavía fue mayor, que a las 3 horas (Fig. 9e). Una mayor fluorescencia fue observada en los óvulos fijados a las 4 horas, que en los fijados a las 2 horas, la cual podría atribuirse, no sólo a la descondensación de la cromatina del espermatozoide sino también a la penetración de otros, suplementarios. La figura 9f muestra un óvulo fertilizado de 4 horas de interacción, en el cual son aparentes un pronúcleo y un núcleo. Ya que está descrito que se desarrolla más tempranamente el pronúcleo masculino (3), probablemente el aquí mostrado corresponda al del espermatozoide.

E) Después de 17 horas de interacción de los gametos, pese a las dificultades para su manejo, señaladas en Métodos, pudimos llevar algunos de estos óvulos hasta la última fase de tratamiento con el fluorocromo. Como se puede observar (Fig. 9g y h), las células sufren un gran hinchamiento y presentan zonas sin fluorescencia y núcleos espermáticos muy descondensados.

Para cada periodo de inseminación fue necesario hacer

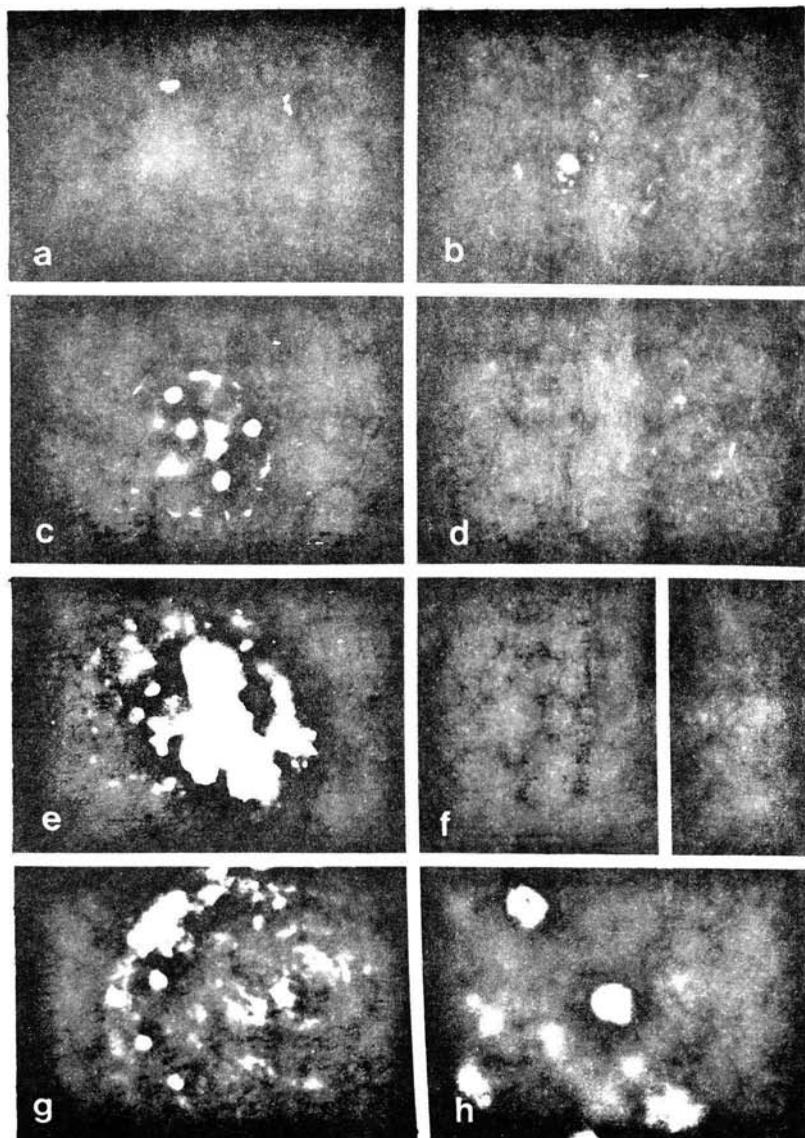
experimentos por separado y cada uno fue repetido por lo menos 3 veces.

#### Efecto de la ausencia de calcio o de potasio, en la fertilización

Para la fusión de los gametos, se requiere la presencia los iones calcio y potasio (25,26,64). Como controles negativos de la fertilización, la interacción de los gametos se llevó a cabo en ausencia de sales de potasio, o bien en el medio suplementado con EGTA, para quelar el calcio.

Para probar el efecto de la ausencia del calcio sobre la fertilización, los óvulos y los espermatozoides capacitados y con reacción acrosomal se preincubaron durante 10 minutos por separado, con EGTA a una concentración final de 17 mM, que equivalía a 10 veces la del calcio en el medio. Se mezclaron 10 microlitros de la suspensión de espermatozoides con los ovulos y se dejaron interaccionar 17 horas.

Desde la preincubación con EGTA, la movilidad de los espermatozoides disminuyó considerablemente con respecto al control. Durante la interacción con los óvulos, los espermatozoides se unieron al gameto femenino, no a todos los óvulos de un mismo experimento. Por otra parte, el tratamiento con el quelante no pareció tener ningún efecto sobre la forma de los óvulos. El EGTA inhibió la fertilización de los 12



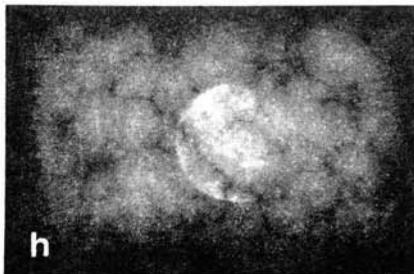
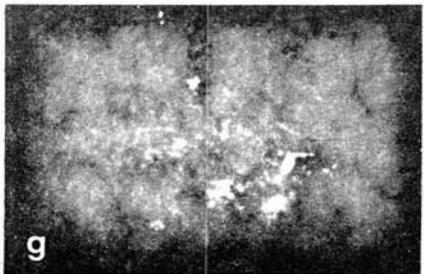
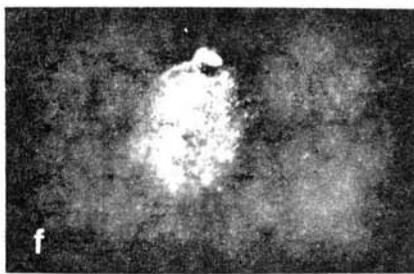
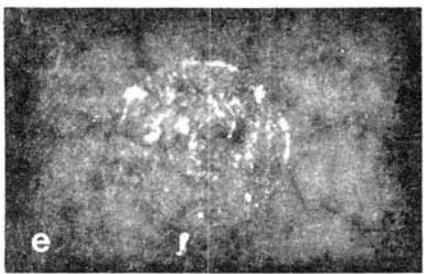
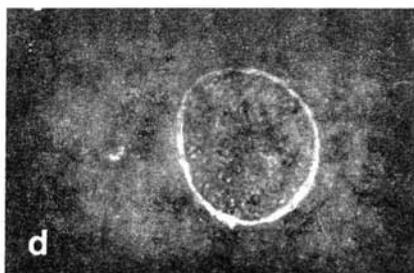
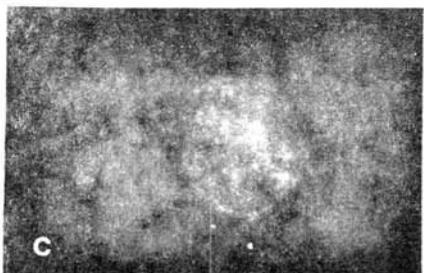
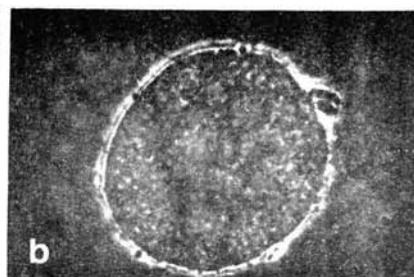
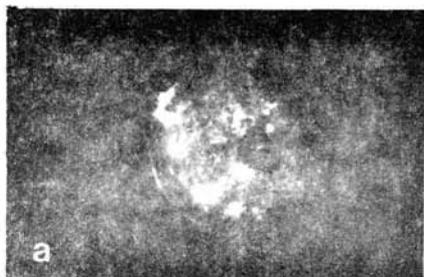


Fig. 9. Óvulos teñidos con el reactivo de Hoechst 33258 para revelar los patrones de distribución y descondensación de cromatina. a) Óvulo control, no fertilizado; b) Óvulo no fertilizado, 15 min postinseminación, se indican la cromatina masculina (m) y la femenina (f). c) Óvulo, fertilizado de 2 horas de co-incubación. Nótese el inicio de la descondensación de las cabezas espermáticas. d) Óvulo fertilizado 3 horas después de la inseminación, es aparente la presencia de más de espermatozoides hinchados en el citoplasma del óvulo. e) y f) Óvulos fertilizados 4 horas postinseminación. En e) óvulo con un número mayor de espermatozoides descondensados que d). En f) un óvulo 4 horas postinseminación que presenta un pronúcleo y f') es el mismo óvulo observado a mayor aumento. g) óvulo de 17 horas postinseminación y h) observado a mayor aumento.

Fig. 10. Inmunolocalización de la calmodulina a lo largo de la co-incubación óvulo-espermatozoide. a) y c) Localización de CaM en óvulos 15 min y 2 horas después de la inseminación. b) y d) los mismos óvulos (a y c) en contraste de fases. e) y g) Óvulos a las 3 y 4 horas postinseminación. Nótese un cambio en el patrón de fluorescencia con respecto a las figuras a) y c). f) y h) Óvulos control, no fertilizados, 2 y 17 horas postinseminación, respectivamente.

óvulos tratados (2 experimentos) contra sus controles paralelos, 12 óvulos, en los que la fertilización fue de 80%.

Por otra parte, la fertilización también fue nula cuando la interacción se realizó en ausencia de potasio en el medio (28 óvulos, 2 experimentos); aun cuando la ausencia de potasio casi no alteró la movilidad de los espermatozoides, y la adhesión al óvulo ocurría; aunque no tan fuertemente, ya que después de 3 ó 4 lavados algunos óvulos se observaban libres de espermatozoides.

Immunolocalización de la calmodulina en los gametos durante la fertilización

La distribución de la calmodulina en los óvulos inseminados se determinó en muestras que fueron fijadas a los 15 min, 2,3 y 4 horas de iniciada la interacción. En los óvulos mantenidos en interacción con los espermatozoides por 17 horas, no fue posible realizar la inmunotinción para calmodulina, debido a su labilidad.

La inmunotinción (IFI) para calmodulina, de los óvulos fijados a los 15 minutos de inseminación, produjo fluorescencia en la célula, similar a la observada en los ovulos no fertilizados, formando un entramado en ella y un halo discontinuo a su alrededor. El sitio de liberación del primer cuerpo polar mostró una mayor concentración de calmodulina (Fig. 10a).

En los espermatozoides que interaccionaron con el óvulo, no se distinguió fluorescencia en la parte del flagelo que sobresalía del óvulo (Fig. 10a y b), pero en este mismo espermatozoide se pudo distinguir una banda fluorescente, quizá de la región ecuatorial y un punto fluorescente en la unión del flagelo con la cabeza (Fig. 10a).

En las células fijadas 2 horas después de la inseminación, la fluorescencia siguió cubriendo a toda la célula, y el halo periférico no fue tan definido (Fig. 10c). La fluorescencia no fue homogénea, formó un entramado y en algunas regiones se presentó más concentrada. En la figura 10d, que corresponde al mismo óvulo de la Fig. 10c, pero en contraste de fases, se pueden apreciar espermatozoides unidos a la superficie del óvulo. En ellos no se distingue fluorescencia ni aun en los flagelos que sobresalen (Fig. 10c).

En general, en los óvulos inseminados hasta por dos horas, la presencia de la calmodulina en los espermatozoides unidos a ellos fue difícil de distinguir.

En los óvulos co-incubados con los espermatozoides durante 3 horas, la fluorescencia dejó de ser homogénea (Fig. 10e). Aparentemente estas células contenían una cantidad menor de calmodulina, o bien ésta se concentró en regiones en las que se observó fluorescencia muy brillante. Sin embargo, no es posible distinguir si el óvulo sufrió realmente una pérdida, un

enmascaramiento de calmodulina, una distribución en un área mayor, o bien una redistribución. En estas células se observó el halo, discontinuo, y algunas regiones del óvulo presentaban un punteado fluorescente, mucho más fino que el mostrado por los óvulos de 15 min y 2 horas de inseminación.

Algo muy notable a las 3 horas de interacción de los gametos, fue la presencia evidente de calmodulina en los espermatozoides unidos al óvulo. La fluorescencia fue observada en todo el flagelo. También, la cabeza hinchada dentro del óvulo mostraba fluorescencia intensa, en la región postacrosomal se distinguía el cono fluorescente, y en la región anterior de la cabeza sin acrosoma se veían grumos muy brillantes (Fig. 10 e), probablemente calmodulina del óvulo.

En las células fijadas a las 4 horas de la inseminación, la fluorescencia disminuyó considerablemente, ya no fue observable el halo aunque sí el punteado fino (Fig. 10g). En la misma figura puede apreciarse que el óvulo está muy hinchado.

Los espermatozoides unidos a estos óvulos mostraron fluorescencia a lo largo de todo su flagelo, en la unión de éste con la cabeza, en la banda ecuatorial y sobre la cabeza misma, algunos presentaron fluorescencia extremadamente concentrada.

En la figura 10f y h, se muestran 2 óvulos que se hicieron interaccionar con espermatozoides durante 2 y 17 horas

respectivamente, en un medio carente de potasio. La fluorescencia que muestran estas células "no fertilizadas" es indistinguible de la presentada por los óvulos control no inseminados y que fueron fijados poco después de su obtención.

Efecto de la trifluoroperazina sobre los espermatozoides y en la interacción óvulo-espermatozoide.

La trifluoroperazina a las 2 concentraciones ensayadas (1 ó 10 micromolar), aceleró en pocos minutos, la presentación de la reacción acrosomal, cuando la droga fue añadida a los espermatozoides capacitados, que habían iniciado la reacción. Treinta minutos después de la adición de la droga (1 micromolar), se observó un incremento del 20% de la reacción acrosomal con respecto al control. Una cantidad mayor de espermatozoides sin acrosoma y con movimiento hiperactivado fue observada a los pocos minutos de la adición de la droga, en comparación con el control.

Por otra parte, los gametos pretratados (10 min) con trifluoroperazina y puestos a interaccionar en presencia de la droga, se fusionaron. El porcentaje de fertilización fue similar al obtenido en las incubaciones control, con gametos sin pretratamiento e incubación en ausencia del antagonista de calmodulina (Tabla 2). Cuando las células fueron observadas al microscopio de luz, a la hora de iniciada la interacción en presencia de la droga en todos los casos se vieron muchos

espermatozoides unidos a los óvulos. Además, ocurrió la descondensación de los espermatozoides internalizados y la droga no causó ninguna alteración aparente a la forma del óvulo, aún después de 17 horas de incubación.

Tabla 2. Efecto de la trifluoroperazina ( TFP ) sobre la fertilización heteróloga *in vitro*

TFP (micromolar)	Número de óvulos		Fertilización (%)
	Examinados	Penetrados	
0	25	17	68
1	25	15	60
0	31	25	80
10	17	13	76

Los espermatozoides fueron incubados en MCM-PL, con 2.8 mM de K, a 37 C, hasta que se observó reacción acrosomal (2-2.5 horas). Se les añadió la TFP (1 ó 10 micromolar, concentraciones finales) y la droga se dejó actuar durante 10 minutos. Una alícuota (10 microlitros) de la suspensión de espermatozoides se vació a la suspensión de óvulos, tratados paralelamente por el mismo tiempo y con la misma concentración de TFP. Los gametos se dejaron interaccionar por 17 horas en presencia de la droga. La fertilización se valoró por la técnica de microscopía de contraste de fases.

Efecto de los anticuerpos anticalmodulina y de las IgGs de suero de borrego, no inmune, sobre la fertilización

La tinción positiva que presentaron con anticalmodulina los óvulos vivos, reforzó la posibilidad de la presencia de

esta proteína en la superficie externa de los óvulos. Consideramos que, si al añadir el anticuerpo anticalmodulina ocurriera una interacción específica, esto podría bloquear la fusión de los gametos, si la calmodulina participara en dicho proceso. Así, un dato positivo de inhibición sería una indicación más en apoyo a la localización externa de la calmodulina.

Los óvulos fueron incubados 60 min en el medio MCM-PLA añadidos de: a) anticuerpos anticalmodulina, b) IgGs de suero de borrego no inmune y c) el tercer lote sin ninguna adición extra. En seguida fueron inseminados, sin cambiar el medio de incubación de los óvulos.

En el control sin anticuerpos, la penetración fue del 90%, 29 de los 32 óvulos examinados fueron fertilizados. Por el tratamiento con anticalmodulina, sólo el 7.4% de los óvulos fueron penetrados, 2 de 27 óvulos examinados. Cuando los óvulos fueron tratados con suero de borrego no inmune, la fertilización fue inhibida 100%, en 22 óvulos examinados. Los óvulos provenían de 4 experimentos.

La presencia de los anticuerpos (anticalmodulina o IgGs de suero normal de borrego) afectaron negativamente la movilidad de los espermatozoides, más los segundos que los primeros, la observación fue realizada una hora después de iniciada la inseminación. En presencia de los dos tipos de anticuerpos hubo unión de los espermatozoides al óvulo. Una observación interesante fue, que en las incubaciones con

anticalmodulina, los espermatozoides adheridos al óvulo mostraban mayor movilidad, que los no adheridos, y no eran separados del óvulo con los lavados, después de 17 horas de interacción. Mientras que en los óvulos tratados con las IgGs normales, el lavado separaba de los óvulos a todos los espermatozoides. El tratamiento con los anticuerpos produjo hinchamiento en la mayoría de los óvulos desde la primera hora de incubación, algunos de los cuales se rompieron.

## DISCUSION

Está bien establecido que el calcio participa en algunos procesos relativos a la fertilización (23,32,33,65) y se ha sugerido un papel potencial de la calmodulina en ellos (32-34,41,49,50,65). Esta hipótesis se basa por una parte, en la cantidad de calmodulina presente en los gametos: en el óvulo (38,40,42,43,45-47) y en los espermatozoides (35,38,49); por otra parte en la presencia de CaM, en las estructuras de los gametos involucradas en los procesos dependientes del calcio.

La presencia y concentración de calmodulina en óvulos de diferentes especies ha sido comunicada: en los de los anélidos (47,56), estrella de mar (40,55), anfibios (46), erizo de mar (38,39) y ratón (45). Sin embargo, sólo ha sido descrita la distribución que guarda la proteína en las cortezas aisladas de los óvulos del erizo de mar (41). Así, la descripción hecha en este trabajo de la localización de la calmodulina en el gameto femenino es la primera en este género.

Localización de la calmodulina en los óvulos desnudos fijados y permeabilizados

En los óvulos del hámster no se presentó un patrón definido de localización de la calmodulina (Fig.2-4). La

distribución de la proteína varió no sólo con respecto al tamaño del óvulo, sino aún entre los óvulos de diámetro similar. Las características que queremos remarcar para discutir son: a) la menor cantidad y distribución homogénea de la CaM, que presentaron los óvulos de diámetro pequeño, b) La presencia de un entramado rugoso, más general en los óvulos de tamaño medio y grande, c) la presencia de CaM en el cuerpo polar y en el sitio de su liberación y d) el halo fluorescente.

Los óvulos del hámster presentaron un alto contenido de calmodulina detectada por IFI y la concentración de la proteína fue menor en los óvulos pequeños. En general todos los óvulos, independientemente de su diámetro mostraban el primer cuerpo polar. La presencia de éste significa que previo a la ovulación los gametos reanudaron la meiosis, detenida en el diploteno I. Pero, probablemente no todos alcanzaron el mismo grado de crecimiento, que requiere de la síntesis de proteínas y quizás, para el óvulo del hámster de la calmodulina entre ellas. Esto podría explicar el menor contenido de CaM que se observa en los óvulos pequeños. En apoyo a lo anterior podemos indicar que ocurre un incremento en la concentración de la calmodulina coincidiendo con la ruptura de la vesícula germinal durante la reanudación de la meiosis en los óvulos de los anfibios (46), pero no en los óvulos de la estrella de mar (55).

El entramado fluorescente observado en los óvulos de diámetro mediano y grande podría ser producido por las microvellosidades de la membrana plasmática; ya que en el

interior de las microvellosidades de las células (epitelio intestinal) existen componentes del citoesqueleto, en cuya estructuración participa la calmodulina (67). Para explicar la distribución homogénea de CaM que se observó en los óvulos de diámetro pequeño podríamos sugerir: a) que en los óvulos pequeños la síntesis masiva de CaM aún no se efectuara y por consiguiente la microvellosidad carecería de CaM; lo que sugeriría un citoesqueleto no estructurado, b) que en las microvellosidades de los óvulos pequeños ya exista CaM, en menor cantidad que en los de mayor tamaño; pero debido a que el número de microvellosidades no aumenta con el diámetro de la célula (3,15), la distancia entre los microvellos sería menor en los óvulos pequeños y por lo tanto su definición no se logre.

Respecto a la alta concentración de CaM observada en el cuerpo polar Fig. 2d), es probable que la CaM provenga de la unida al huso meiótico (Fig. 2d), en donde se observa muy concentrada. El cuerpo polar contiene la mitad del huso y un conjunto de cromosomas homólogos y muy poco citoplasma, por lo tanto la CaM no se diluye. Ya previamente se ha descrito una asociación de CaM con el sistema microtubular del sistema mitótico (27,70). La CaM que bordea el sitio de liberación del cuerpo polar probablemente participe junto con la actina en la separación del mismo, que es inhibida por citocalasina (62).

Lo discutido hasta este punto, puede referirse indistintamente a los óvulos liberados de la ZP, por el

tratamiento enzimático con tripsina o por acción mecánica. Respecto a la presencia consistente del halo y el mayor grosor del mismo, que presentaron los óvulos desnudados mecánicamente, con respecto a los tratados con tripsina, quisiéramos proponer que las diferencias se deban a una mayor concentración, en los óvulos DMec, de CaM muy cercana a la membrana plasmática. Esta membrana pudo ser afectada por la tripsina, posiblemente más en la parte exterior. Esto podría sugerir una localización extracelular de CaM. Sin embargo debido a la permeabilización practicada en estos óvulos no es posible definir si la CaM se localiza externamente. La presencia de CaM extracelular podría tener implicaciones importantes en la fusión de los gametos. Por esta razón consideramos prioritario el tratar de definir la situación de la CaM que originaba al halo en el óvulo. Así este punto será retomado a lo largo de la discusión.

#### Localización de CaM en óvulos fijados no permeabilizados

La presencia del halo periférico en los óvulos DMec no permeabilizados (Fig. 4c), sugeriría nuevamente, que existiera CaM en el exterior. Sin embargo existen comunicaciones de que la fijación puede provocar cambios pequeños en la estructura de la célula, que resultan en la formación de orificios (68). El hecho de que los óvulos DTrip sin permeabilizar, mostraran patrones de CaM indistinguibles de los patrones mostrados por los óvulos permeabilizados; aunado a que en los óvulos DMec no

permeabilizados se observara un entramado pálido fluorescente (Fig. 4d) bordeando granulaciones oscuras, cuando las observaciones se realizaron en planos más profundos, nos hace suponer que el anticuerpo en las células no permeabilizadas, si haya penetrado a la célula, aunque quizás en menor cantidad. Debido a estas consideraciones la presencia externa de CaM no pudo afirmarse aún con certeza.

#### Localización de la calmodulina en óvulos vivos

La observación del halo de CaM en los óvulos tratados por IFI in vivo sugiere nuevamente que la proteína revelada se encuentra en la superficie externa. Una evidencia más en apoyo es el hecho de que la gran mayoría de estas células no presentaron el entramado fluorescente (Fig. 5). Adicionalmente, la pérdida rápida de la fluorescencia en estas células, podría indicar una localización superficial específica de CaM, ya que el control con IgGs de suero preinmune no dio ninguna fluorescencia (Fig. 7).

#### Detección de CaM en la ZP

La composición de la ZP es conocida y se habla de familias de glicoproteínas (14). Esta capa amorfa es producto tanto del óvulo como de las células de la granulosa. Durante el periodo preovulatorio la ZP está en contacto directo con el

óvulo, si en éste se encontrara CaM en el exterior, la ZP podría mostrar CaM en su superficie interna. La tinción de CaM en los óvulos vivos con ZP (Fig. 6d y e), dio una fluorescencia muy tenue de toda la región, aparentemente específica de CaM, ya que sus controles fueron negativos (Fig. 7d). La fluorescencia observada en la ZP fue igualmente tenue, como la observada sobre los óvulos sin ZP teñidos *in vivo*.

La fijación en estos óvulos, produjo en la ZP algún cambio conformacional, que se tradujo en el reconocimiento de los anticuerpos antiCaM (Figs. 6a, b y c), o bien, que la nueva conformación permitió la entrada al segundo anticuerpo (con fluoresceína) pero no su total eliminación durante el lavado.

#### Localización de la CaM en los espermatozoides.

Nuestro interés se enfocó en observar la localización de la CaM en los espermatozoides con RA, o sea en los espermatozoides con capacidad para fertilizar. Mostramos que la región postacrosomal, señalada como posible sitio de reconocimiento del óvulo, presentaba CaM. Esto concuerda con las observaciones previas realizadas en nuestro laboratorio (34), en las que la RA fue producida de manera sincrónica. Una diferencia de nuestros resultados con los de Trejo y Mújica (34) es el porcentaje tan bajo, aquí mostrado, de espermatozoides con banda fluorescente a nivel de la región

ecuatorial. Esta diferencia podría ser atribuida a la sugerencia de Trejo y Mújica de que la localización de CaM en esta región es transitoria.

#### El sistema de fertilización heteróloga

Con el sistema de fertilización adoptado se comprobó la necesidad de los iones calcio y potasio para la fertilización, como había sido demostrado por Yanagimachi (64). Con la técnica de marcaje con Hoechst (Fig. 9) se pudo discernir tempranamente (2 horas de co-incubación), igual que por contraste de fases, la internalización y descondensación del núcleo espermático (Fig. 8). La técnica de Hoechst es recomendable cuando se desea practicar en los óvulos alguna otra determinación, como en nuestro caso el marcaje de CaM, ya que en la valoración de la fertilización por contraste de fases el óvulo observado debe ser viable y no es fácilmente recuperable debido a que la observación se realiza entre porta y cubreobjetos.

La fertilización heteróloga, como había sido previamente descrito no evita la polispermia (69). El óvulo del hámster depende totalmente de la reacción de la zona para evitar la entrada de espermatozoides supernumerarios (15). Si ocurriera un bloqueo a nivel de membrana plasmática del óvulo, ya sea porque la fusión de los gametos (o por la reacción cortical) produjera un cambio del potencial de la membrana, el impedimento o bloqueo de la entrada de espermatozoides

suplementarios debió ser transitorio, ya que los datos mostrados indican un alto grado de polispermia, la cual se incrementa con el tiempo de incubación (Fig. 8b). En los óvulos del hámster debe existir un gran contenido del factor descondensante de la cromatina, ya que todos los núcleos espermáticos internalizados presentaron un alto grado de descondensación, cuando la observación se realizó 17 horas después de iniciada la interacción. La formación de pronúcleos si se logró distinguir (Fig. 8): sin embargo no pudo visualizarse si más de un núcleo espermático avanzó hasta la etapa de pronúcleo.

#### Distribución de la calmodulina en los óvulos fertilizados

Bajo las condiciones de detección de CaM empleadas en este trabajo, no fue posible distinguir un cambio de distribución de la proteína en el óvulo hasta las 2 horas de inseminación. El patrón de tinción de CaM que presentaron a las 3 horas fue diferente al mostrado por los óvulos no fertilizados (que no fueron puestos en contacto con espermatozoides) o por los óvulos inseminados en ausencia de potasio. Esta nueva distribución sugiere un rearrreglo de CaM en hilos delgados, que permite sugerir la colocación de CaM con los microtubulos y con los centros organizadores de éstos (70). La CaM se ha detectado asociada a los microtubulos del huso mitótico (27,70) y en este trabajo se mostró, que

probablemente también está asociada al huso meiótico (Fig. 3c). Los microtubulos en el huevo son esenciales para la meiosis, incluyendo la formación del cuerpo polar y la migración de los pronúcleos (15,70). En la fertilización heteróloga realizada en este trabajo, la presencia de pronúcleos fue aparente hasta las 4 horas de inseminación, pero el rearrreglo de CaM lo observamos a partir de las 3 horas. La formación de los pronúcleos pudo ser retrasada por la polispermia (71), o bien, de los resultados se podría sugerir que la activación y rearrreglo del citoesqueleto en el óvulo es un evento previo a la formación de los pronúcleos, y no un evento simultáneo o paralelo con la formación de éstos (6).

En el espermatozoide, durante su interacción con el óvulo, la distribución de CaM no pudo seguirse debido a la intensa fluorescencia del gameto femenino. El tiempo de exposición para la fotografía de los gametos en interacción estaba dado por el óvulo, por ello el flagelo espermático con una fluorescencia mucho menor no era fácilmente distinguible. Cuando la cabeza del espermatozoide con RA es internalizada, la membrana plasmática que la cubre queda formando parte de la correspondiente del óvulo (72,73). El hecho de observar espermatozoides, en el interior del óvulo, con un cono fluorescente en su región postacrosomal indica, que la CaM se localiza por debajo de la membrana plasmática y que su unión, a proteínas que la reconocen es fuerte. Esto podría sugerir la participación de la CaM del espermatozoide en procesos que

deberán ocurrir en la región postacrosomal del gameto, como la descondensación de la cromatina, que se ha sugerido se inicia en esta región.

#### Efecto de la trifluoroperazina

Sobre los espermatozoides. La adición de trifluoroperazina (1 ó 10 micromolar) a espermatozoides que han completado algunas de las etapas de su capacitación los aceleró la presentación de la reacción acrosomal (véase en Resultados: Efecto de la trifluoroperazina sobre los espermatozoides). Se ha descrito un efecto dual de este fármaco antagonista de la calmodulina: a concentraciones bajas (1-10 micromolar) inhibe la reacción acrosomal, mientras que a concentraciones altas (25-100 micromolar), la inducen (35,52). Nuestros resultados podrían interpretarse de la siguiente manera: en los espermatozoides en los que la capacitación ha avanzado en algunas de sus etapas, el antagonista de CaM a concentración baja no inhibe la capacitación ni a la reacción acrosomal, y por el contrario, las acelera.

A diferencia de lo comunicado por Aitken (60), en este trabajo se observó una estimulación en la movilidad de los espermatozoides cuando fueron tratados con TFP (1 ó 10 micromolar). Lo anterior es explicable, ya que Aitken indica que se requiere de una concentración 80 micromolar, para que ocurra una disminución en la movilidad de los espermatozoides del hombre. Sin embargo, este autor no observó estimulación con

el uso de una dosis similar a la nuestra (10 micromolar). Para explicar lo anterior podría sugerirse una diferencia de especie, o bien un efecto diferente del fármaco sobre el gameto, dependiente del estadio de su capacitación.

En la interacción óvulo-espermatozoide. En concordancia con los resultados de Aitken (60), la preincubación e interacción de los gametos en presencia de TFP (1 ó 10 micromolar) no inhibió la fertilización, y aparentemente aumentó el número de espermatozoides que penetraron por óvulo. Estos resultados podrían atribuirse a las acciones hidrofóbicas inespecíficas del antagonista de CaM (35). Asumiendo que la CaM participara directamente en la fusión óvulo-espermatozoide, un efecto de la tripsina (utilizada para retirar la ZP) sobre la CaM, que la vuelva insensible a TFP (pero no interfiera en su función) no puede ser descartado (47); aunque tendría que aceptarse que la función de la CaM en la fusión no se altera.

Efecto de los anticuerpos antiCaM en la interacción óvulo-espermatozoide

La inhibición de la fertilización de los óvulos, pretratados e incubados con los anticuerpos anticalmodulina, inseminados con espermatozoides fertilizantes, podría atribuirse: 1) al bloqueo específico de la calmodulina, 2) a un bloqueo inespecífico y 3) a la menor movilidad que presentaron los espermatozoides.

Para considerar como causa de la no fertilización la primera sugerencia señalada, tendría que aceptarse que la CaM fuera un componente que participara directamente en la fertilización y que el el óvulo presentara CaM en su exterior, ya que es muy improbable que los anticuerpos hayan penetrado. De la necesidad de calcio en el medio, para que ocurra la fertilización, proponemos la posible participación de CaM en el proceso, y de los resultados de este trabajo sugerimos, que una parte de la CaM del óvulo se localice en su superficie externa.

Un bloqueo inespecífico podría sugerirse, del hecho de que la fertilización también fue inhibida por las IgGs de suero preinmune de borrego, pero la inhibición por los anticuerpos inespecíficos, podría atribuirse, a la pérdida de la movilidad que causaron sobre los espermatozoides.

La menor movilidad que presentaron los espermatozoides al contacto con los anticuerpos antiCaM, consideramos que no es el factor determinante de la inhibición de la fertilización. Ha sido descrito que el óvulo puede ser fertilizado por espermatozoides inmóviles (15), siempre y cuando carezca de ZP. Además, los espermatozoides sí lograron hacer contacto con el óvulo y su interacción fue firme, ya que se mantenían unidos después de 3 lavados. Esto contrastó con el comportamiento de los espermatozoides puestos a interaccionar con los óvulos en presencia de las IgGs inespecíficas. Con base en estos resultados proponemos que el anticuerpo antiCaM evitó la penetración de los espermatozoides, pero no su fusión al óvulo.

## CONCLUSIONES

1. La cantidad de calmodulina y su distribución en el óvulo del hámster es dependiente del tamaño del gameto. En los óvulos de diámetro intermedio, de 92 a 100 micras, la calmodulina se encuentra más estructurada que en los pequeños (67-84 micras), en los que la calmodulina se observa en menor concentración y distribuida de manera difusa. Estos resultados permiten concluir además, que el óvulo del hámster durante su crecimiento debe sintetizar CaM, igual que se ha observado en el gameto de los anfibios.

2. Los óvulos sin zona pelúcida, fijados, permeabilizados o no, presentaron a la CaM, por IFI, en: a) el cuerpo polar, b) en el sitio de liberación del cuerpo polar, c) formando diversos entramados, d) formando un halo fluorescente. De lo anterior se concluye: 1) que el método empleado para separar a la ZP del óvulo, no influye en el patrón de distribución de la CaM, 2) que en los óvulos sin ZP, la fijación produjo una permeabilización ligera, lo que permitió la entrada de los anticuerpos a la célula.

3. La fijación altera a la ZP, de manera tal, que presenta una reacción inespecífica fuerte al anticuerpo anti calmodulina.

4. El óvulo del hámster no muestra ningún sitio antigénico que reaccione con las IgGs de suero normal de borrego

5. En los espermatozoides capacitados en el medio MCM-PL y que sufrieron la reacción acrosomal de manera espontánea, se detectó la presencia de CaM en la región postacrosomal. De lo anterior, se concluye que durante la RA ocurrió la translocación de la CaM, como ha sido previamente descrito por nuestro grupo (34).

6. La valoración positiva de la fertilización heteróloga, fue posible hasta las 2 horas de co-incubación de los gametos, tanto por microscopia de contraste de fases como por tinción del DNA con el reactivo de Hoechst.

7. La presencia de los iones calcio y potasio, en el medio de fertilización, es indispensable para que la fertilización ocurra, en concordancia con lo comunicado previamente (26, 64).

8. Una alteración del patrón de distribución de CaM en los óvulos es aparente hasta las 3 horas de iniciada la fertilización.

9. El inhibidor de la calmodulina (TFP) aceleró la presentación de la reacción acrosomal de los espermatozoides del

cuyo y no inhibió la fusión de los gametos, ni la formación de los pronúcleos. Se sugiere que el complejo Ca-calmodulina no participe directamente en los 3 procesos mencionados. Aunque, el tratamiento de los gametos con anticalmodulina inhibió la fertilización. De estos resultados en conjunto, concluimos que, no es posible aún establecer si la calmodulina tiene una función en la fusión de los gametos.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Wasserman, P.M. (1987) The biology and chemistry of fertilization. *Science*, 235: 553-560.
- 2.- Mójica, A. y Jaramillo, F. (1980) La gametogénesis y la fertilización en los mamíferos. En: *Temas selectos de biología celular* (eds. R. López, V. Tsutsumi, y E. Frixione), pp. 230-250 SEP/COSNET/CINVESTAV, México.
- 3.- Fraser, L. (1984) Mechanisms controlling mammalian fertilization. *Oxford Rev. of Reprod. Biol.*, 6: 174-225.
- 4.- Bavister, B. D. (1980) Recent progress in the study of early events in mammalian fertilization. *Develop. Growth. & Differ.*, 22(3): 385-402.
- 5.- Bavister, B. D. (1981) Analysis of culture media for *in vitro* fertilization and criteria for success. In: *Fertilization and embryonic development in vitro* (L. Mastroianni & J. D. Biggers, eds.), pp. 41-60 Plenum Press, New York.
- 6.- Yanagimachi, R. (1984) Zona-free hamster eggs: their use in assessing fertilizing capacity and examining chromosomes of human sperm. *Gam. Res.*, 10: 187-232.
- 7.- Yanagimachi, R. (1981) Mechanisms of fertilization in mammals. In: *Fertilization and embryonic development in vitro* (L. Mastroianni & J. D. Biggers, eds.), pp. 81-82 Plenum Press, New York.
- 8.- Bedford, J. M., Moore, H. D. M. & Franklin, L.E. (1979) Significance of the equatorial segment of the acrosome of the spermatozoon in eutherian mammals. *Exp. Cell Res.*, 119: 119-126.
- 9.- Shapiro, B. M., Schackmann, R. W., Gabel, C. A., Farance, M. L. Eddy, E. M. & Klebanoff, S. J. (1980) Molecular alterations in gamete surfaces during fertilization and early development. In: *The cell surface: Mediator of development processes*. (S. Subtelny, & N. K. Wessells, eds.), pp. 127-150. Academic Press, New York.
- 10.- Grabers, D. L. (1989) Molecular basis of fertilization. *Ann. Rev. Biochem.*, 58: 719-742.
- 11.- Jones, R., Brown, C.R. & Lancaster, R.T. (1988) Carbohydrate-binding properties of boar sperm proacrosin and assessment of this role in sperm-egg recognition and adhesion during fertilization. *Devel. Biol.*, 102: 781-792.

- 12.- Bedford, J.M. (1983) Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in the eutherian mammals. *Biol. Reprod.*, 28: 108-120.
- 13.- Bleil, J.D. & Wasserman, P.M. (1983) Sperm-egg interactions in the mouse: Sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Devel. Biol.*, 95: 317-324.
- 14.- Dunbar, B.S. & Wolgemuth D.J. (1984) Structure and function of the mammalian zona pellucida, a unique extracellular matrix. *Mod. Cell Biol.*, 3: 77-111.
- 15.- Yanagimachi, R. (1988) Mammalian fertilization. In: *The physiology of reproduction* (E. Koobil & J. Neill et al. eds.), pp. 135-185. Raven Press. Lid New York.
- 16.- Cherr, G.N., Drobnis, E.Z. & Katz, D.F. (1988) Localization of cortical granule constituents before and after exocytosis in the hamster egg. *J. Exp. Zool.*, 246: 81-92.
- 17.- Menezes, J. & Pete, J. (1985) Role of the vitellus in the block to polyspermy in golden hamster eggs. *Gam. Res.*, 11: 305-309.
- 18.- Katz, D.F. & Yanagimachi, R. (1981) Movement characteristics of hamster and guinea pig spermatozoa upon attachment to the zona pellucida. *Biol. Reprod.*, 25: 785-791.
- 19.- Hirao, Y-H. & Hiraoka, J-I. (1987) Surface architecture of sperm tail entry into the hamster oocyte. *Dev. Grow. & Differ.*, 29(2): 123-132.
- 20.- Shalgi, R., Matityahu, A. & Nebel, L. (1986) The role of carbohydrates in sperm-egg interaction in rats. *Biol. Reprod.*, 34: 46-452.
- 21.- Hyttel, P., Xu, K.P. & Greeve, T. (1988) Scanning electron microscopy of *in vitro* fertilization in cattle. *Anat. Embryol.*, 178: 41-46.
- 22.- Carafoli, E. & Penniston, J.T. (1985) The calcium signal. *Scientific Amer.*, 253: 70-78.
- 23.- Schackman, R.W. & Shapiro, B.M. (1982) Calcium and the metabolic activation spermatozoa. *Calcium and cell function* 11: 339-353.
- 24.- Meizel, S. (1978) The mammalian sperm acrosome reaction. A biochemical approach. In: *Development in mammals*. (M.H. Johnson, ed.), pp. 1-64 North-Holland, New York.

- 25.- Yanagimachi, R. (1978) Calcium requirement for sperm-egg fusion in mammals. *Biol. Reprod.*, 19: 949-958.
- 26.- Mortimer, D. (1988) Calcium dependence of human sperm fertilizing ability. *J. Exp. Zool.*, 246: 194-201.
- 27.- Dedman, J.R. (1984) The role of calmodulin in the mediation of intracellular calcium. In: *Mechanisms of intestinal electrolyte transport and regulation by calcium* (A R Liss, Inc. ed) New York.
- 28.- Means, A.R., Lagace, L., Guerriero, Jr., & Chafouleas, J.G. (1982) Calmodulin as a mediator of hormone action and cell regulation. *J. Cell Biochem.*, 20: 317-330.
- 29.- Saling, P.M., Storey, B.T. & Wolf, D.P. (1978) Calcium-dependent binding in mouse epididymal spermatozoa to the zona pellucida. *Devel. Biol.*, 65: 515-525.
- 30.- Cheung, W.Y. (1980) Calmodulin-An introduction. In: *Calcium and cell function*, Vol.II (W.Y. Cheung, ed.), pp. 1-12 Academic Press, New York..
- 31.- Klee, C.B., Crouch, T.H. & Richman, T. (1980) Calmodulin *Ann. Rev. Biochem.*, 49:489-515.
- 32.- Jones, H.P., Lenz, R.W., Palevitz, A. & Cormier, M.J. (1980) Localization of calmodulin in mammalian spermatozoa by immunofluorescence methods. In: *Calmodulin and cell function* (D.M. Watterson, F.F. Vicenzi, eds.), pp. 393-394 Academic Press New York..
- 33.- Camatini, M., Anelli, G. & Casale, A. (1986) Immunocytochemical localization of calmodulin in intact and acrosome-reacted boar sperm. *Eur. J. cell Biol.*, 41: 89-96.
- 34.- Mújica, A. & Trejo, R. (1986) Localización de la calmodulina en los espermatozoides del cuyo durante su capacitación y reacción acrosomal. XVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica A. C.
- 35.- Lenz, R.W. & Cormier, M.J. (1982) Effects of calmodulin binding drugs on the guinea pig spermatozoon acrosome reaction and the use of this drugs as vaginal contraceptive agent in rabbits. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 383: 85-97.
- 36.- Sano, K.C. (1983) Inhibition of acrosome reaction of sea urchin spermatozoa by a calmodulin antagonist, N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphtalene sulfonamide (W-7). *J. Exp. Zool.*, 226: 471-473.
- 37.- Nagae, T. & Srivastava, P.N. (1986) Induction of the

acrosome reaction in guinea pig spermatozoa by calmodulin antagonist W-7. *Gam. Res.*, 14: 197-208.

38.- Burgess, W.H. (1982) Characterization of CaM and calmodulin isotypes from sea urchin gametes. *J. Biol. Chem.*, 257: 1880-1804.

39.- Head, J.F., Mader, S. & Kaminer, B. (1979) Calcium-binding modulator protein form the unfertilized egg of the sea urchin *Arbacia punctulata*. *J. cell Biol.*, 80: 211-218.

40.- Meijer, L. & Guernier, P. (1981) Calmodulin in starfish oocytes. I. Calmodulin antagonists, inhibit meiosis reinitiation. *Dev. Biol.*, 88: 318-324.

41.- Steindhardt, R.A. & Alderton, J.M. (1982) Calmodulin confers calcium sensitivity on secretory exocytosis. *Nature*, 295: 154-155.

42.- Gallien, C.L., Weinman, J., Rainteau, D. & Weinman, S. (1984) Changes in calmodulin level after fertilization and during cleavage in the egg of the urodelan amphibian *Pleurodeles waltlii*. *Exp. cell Res.*, 155: 397-405.

43.- Epel, D., Patton, C., Wallace, R.W. & Cheung, W.Y. (1981) Calmodulin activates NAD kinase of sea urchin eggs: an early event of fertilization. *Cell*, 23: 543-549.

44.- Lenz, R.W., Ax, R.L. & First, N.L. (1982) Proteoglycan production by bovine granulosa cells *in vitro* is regulated by CaM and calcium. *Endocrinology*, 110: 1052-1054.

45.- Bornelaeger, E.A., Wilde, M.W. & Schultz, R.M. (1984) Regulation of mouse oocyte maturation: Involvement of cyclic AMP phosphodiesterase and calmodulin. *Devel. Biol.*, 105: 488-499.

46.- Cartaud, A. & Ozon, R. (1980) *Xenopus laevis* oocyte calmodulin in the process of meiotic maturation. *J. Biol. Chem.*, 255 (19): 9404-9408.

47.- Meijer, L. & Wallace, R.W. (1985) The role of calmodulin in oocyte maturation. In: *Calmodulin antagonists and cellular physiology* (H. Hidaka & D.J. Hartshorne, eds.), pp. 129-145 Academic Press New York..

48.- Nelson, L. et al. (1982) Regulation of calcium distribution in bovine sperm cells: cytochemical evidence for motility control mechanisms. *Cell motility*, 2: 225-242.

49.- Fienberg, J., Weinman, S., Walsh, M.P., Harricane, M.C., Gabrion, J. & Demaille, J.G. (1981) Immunocytochemical and

biochemical evidence for the presence of calmodulin in bull sperm flagellum. *Biochem. Biophys. Acta*, 673: 303-311.

50.- Camatini, M. & Casale, A. (1987) Actin and calmodulin coexist in the equatorial segment of ejaculated boar sperm. *Gam. Res.*, 17: 97-105.

51.- Morse, P.B. & Dedman, J.R. (1984) Calmodulin, a calmodulin acceptor protein and calcimedines: unique antibody localizations in hamster sperm. *J. Cell Biochem.*, 25: 99-303.

52.- Berruti, G., Anelli, G., Camatini, M. (1985) The effects of anticalmodulin drugs on the ultrastructure of boar spermatozoa. *Eur. J. Cell Biol.*, 39: 147-152.

53.- Eckberg, W.R. (1986) Action of calcium-binding proteins in egg maturation and fertilization. *Cell Calcium*, 7: 365-375.

54.- Carroll, A.G. & Eckberg, W.R. (1986) Inhibition of germinal vesicle breakdown and activation of cytoplasmic contractility in *Spisula* oocytes by calmodulin antagonists. *Biol. Bull.*, 170: 43-50.

55.- Dorée, M. (1980) Calmodulin content does not change following hormone-induced meiosis reinitiation in starfish oocytes. *Experientia*, 36: 932-933.

56.- Carroll, A.G. & Eckberg, W.R. (1983) Possible involvement of calmodulin in maturation and activation of *Chaetopterus* eggs. *Dev. Biol.*, 99: 1-6.

57.- Hollinger, T.G. & Alvarez, I.M. (1982) Trifluoroperazine-induced meiotic maturation in *Xenopus laevis*. *J. Exp. Zool.*, 224: 461-464.

58.- Weinman, S., Ores-Carton, C., Rainteau, D. & Puzkin, S. (1986) Immunoelectron microscopic localization of calmodulin and phospholipase A2 in spermatozoa I. *J. Histochem. Cytochem.*, 34(9): 1171-1179.

59.- Epel, D. (1982) The physiology and chemistry of calcium during the fertilization eggs. In: *Calcium and cell function*, Vol. II (W.Y. Cheung, ed.), pp. 355-383 Academic Press New York.

60.- Aitken, R.J., Clarkson, M.J., Hulme, & Henderson, C.J. (1988) Analysis of calmodulin acceptor proteins and the influence of calmodulin antagonists on human spermatozoa. *Gam. Res.*, 21: 93-111.

61.- Meijer, L., Dube, F. & Guerrier, P. (1983) Trifluoroperazine-sensitive step during sea urchin, echinoid

and pelecypod egg activation. *Dev. Grow. Differ.*, 25: 469-475.

62.- Maro, B., Johnson, M.H., Pickering, S.J. & Flach, G. (1984) Changes in actin distribution during fertilization of the mouse egg. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 81: 211-237.

63.- Picard, A. & Dorée, M. (1982) Intracellular microinjection of anticalmodulin drugs does not inhibit the cortical reaction induced by fertilization, ionophore A23187 or injection of calcium buffers in sea urchin eggs. *Dev. Grow. Differ.*, 24(2): 155-162.

64.- Yanagimachi, R. & Amitabha Bhattacharyya (1988) Acrosome-reacted guinea pig spermatozoa become fusion competent in the presence of extracellular potassium ions. *J. Exp. Zool.*, 248: 354-360.

65.- Jones, H.P., Lenz, R.W., Palevitz, B.A. & Cormier, M.J. (1980) Calmodulin localization in mammalian spermatozoa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 77: 2772-2776.

66.- Mújica, & Valdes-Ruiz, M.A. (1983) On the role of glucose in capacitation and acrosomal reaction of guinea pig sperm. *Gam. Res.*, 8: 335-344.

67.- Glenney, J.R., Jr & Weber, K. (1980) Calmodulin-binding proteins of the microfilaments present in isolated brush borders and microvilli of intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, 255: 10551-10554.

68.- Johnstone, A. and Thorpe, R. (1982) *Immunocytochemistry in practice*. Oxford: Blackwell Scientific Publications. pp. 141-146.

69.- Thadani, V.M. (1980) A study of heterospecific sperm-egg interactions in the rat, mouse and deer mouse using *in vitro* fertilization and sperm injection. *J. Exp. Zool.*, 212: 435-453.

70.- Schatten, G.D., Simerly, C. & Schatten, H. (1985) Microtubule configurations during fertilization, mitosis, and early development in the mouse and the requirement for egg microtubule-mediated motility during mammalian fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 82: 4152-4156.

71.- Brandriff, B.F. & Gordon, L.A. (1989) Analysis of the first cell cycle in the cross between hamster eggs and human sperm. *Gam. Res.*, 23: 299-308.

72.- Barros, C. & Herrera, E. (1977) Ultrastructural observation of the incorporation of guinea pig spermatozoa into zona-free hamster oocytes. *J. Reprod. Fert.*, 49: 47-50.

73.- Border, E.M., Fishkind, D.J., Cotran, N.M. & Begg, D (1989) The cortical actin-membrane cytoskeleton of unfertilized sea urchin eggs: Analysis of the spatial organization and relationship of filamentous actin, nonfilamentous actin, and egg spectrin. Dev. Biol., 134: 327-341.