

123

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE CIENCIAS

**“EFECTO DE LA CALRETICULINA EN LA FERTILIZACIÓN HOMÓLOGA Y HETERÓLOGA”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE **BIOLOGO**

PRESENTA:

**JERÓNIMO LÓPEZ ALCANTAR**



ESTUDIOS DE TESIS  
DIRECTOR DE TESIS:

**DR. ADELA MÚJICA MIRANDA**  
**M. EN C. RAFAELA JOSEFINA MUÑOZ GOTERA**

MÉXICO, D.F. FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR





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.

**Paginación**

**Discontinua**



Universidad Nacional Autónoma de México

**M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA**

Jefa de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunico a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Efecto de la calreticulina en la fertilización homóloga y Heteróloga"  
realizado por López Alcantar Jeronimo  
con número de cuenta 09211399-0, quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis M. en C. Rafaela Josefina Muñoz Gotera

Propietario  
Director de Tesis Dra. Adela Mújica Miranda

Propietario Biol. Silvia Juárez Chavero

Suplente M. en C. Rosario Ortíz Hernández

Suplente M. en C. Juan Ocampo López

FACULTAD DE CIENCIAS  
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

Dra. Patricia Ramos Morales



DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGIA

## INDICE

**DEDICATORIA**

**AGRADECIMIENTOS**

**LISTA DE ABREVIATURAS**

**RESUMEN**

INTRODUCCIÓN	1
La reacción cortical y los gránulos corticales	1
La reacción acrosomal y el acrosoma	4
La fertilización	7
La zona pelúcida	8
Bloqueo a la polispermia	9
La calreticulina	9
Funciones de la calreticulina	13
sp50	15
HIPÓTESIS.	16
OBJETIVOS	17
MATERIALES Y MÉTODOS.	18
Superovulación y extracción de los óvulos del hámster.	18
Superovulación y extracción de los óvulos del ratón.	18
Obtención de los óvulos sin sus envolturas	19
Obtención, capacitación y valoración de la reacción acrosomal de los espermatozoides del ratón.	20
Obtención y capacitación de los espermatozoides del cobayo	21
Fertilización <i>in vitro</i> de los óvulos del ratón y efecto de la calreticulina en la fertilización homóloga del ratón y heteróloga hámster-cobayo	22
Valoración de la fertilización.	23
Análisis estadístico	24

<b>RESULTADOS</b>	25
Valoración del tiempo de capacitación de los espermatozoides de los ratones Balb/c y NMR-I en tres diferentes medios	25
Análisis estadístico de la habilidad de las cepas de ratón Balb/c y NMR-I para llevar a cabo la reacción acrosomal	26
Valoración de la fertilización en el sistema homólogo y heterólogo.	33
1. Tinción del DNA con el fluorocromo vital Hoechst 33342	33
2. Observación al microscopio óptico de la presencia de los pronúcleos masculino y femenino	33
3. Observación de la primera división de segmentación	34
Inhibición de la fertilización homóloga y heteróloga por CRT	36
<b>DISCUSIÓN.</b>	41
CRT en la fertilización	43
<b>CONCLUSIONES.</b>	45
<b>REFERENCIAS.</b>	45
<b>APENDICE</b>	59

## **AGRADECIMIENTOS**

A La Universidad Nacional Autónoma De México, a la Facultad de Ciencias y al CINVESTAV-IPN, por abrirme sus puertas para realizar mis aspiraciones de estudio y conocimiento.

A la Dra. Adela Mújica Miranda por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme colaborar con su equipo de trabajo y por permitirme hacer uso de sus instalaciones, así como por el apoyo económico que me brindo durante mi estancia en su laboratorio y por tratar de mantener el contacto conmigo en toda ocasión que si finalmente no se logro del todo estoy muy consciente de que mi disposición no fue total para tal motivo, pero quiero agradecer su valiosa ayuda en la revisión de esta tesis, por sus acertadas correcciones, que hacen de esta tesis un excelente trabajo, **GRACIAS**.

A la ahora Dra. Rafaela Josefina Muñoz Gotera por sus atenciones para conmigo y por soportarme durante casi un año en el que me asesoro en la parte experimental, por brindarme parte de sus conocimientos y por haecerme ver que todo logro requiere de un gradisisimo esfuerzo y que nunca basta el 100 %, sino que hay que dar el 200 % de uno mismo para conseguir alcanzar las metas muchas gracias por los momentos fuera del trabajo de laboratorio, momentos que hacen que una relación se fortalezca.

A la M. en C. Rosario Ortíz Hernández por hecesre participe en la revisión de mi tesis y por sus acertados consejos que al igual que los consejos de los otros revisores, contribuyeron a la mejoría del contenido de esta tesis, **GRACIAS**.

A la bióloga Silvia Juárez Chavero profesora durante mi paso en las materias optativas en la licenciatura y por hacerse participe también en la revisión de esta tesis, por su dedicación que tuvo en la revisión y por ser tan buena onda, mil **GRACIAS**.

**Al M. en C. Juan Ocampo López por su disposición en la revisión de esta tesis y por sus acertados consejos que igualmente contribuyeron en la mejora de la misma, por su amistad, GRACIAS.**

**A la bióloga Ana Lilia Roa Espitia (pistolita), por su ayuda durante mi estancia en el laboratorio, brindandome muy amablemente parte de sus valiosos conocimientos en mis dudas y por su amistad, GRACIAS.**

**Al Dr. Saul Villa Treviño, y a todo su personal técnico, auxiliar y estudiantil, por facilitar el uso de sus equipos de laboratorio y sus reactivos para realizar las fertilizaciones *in vitro*. Al Dr. Homero Hernández por la otorgación de algunos reactivos muy importantes para la estandarización de la capacitación de los espermatozoides del ratón.**

**A Enrique, por su apoyo y asesoría en mis dudas referentes a la experimentación, GRACIAS.**

**A la bióloga Margarita Zarate por su ayuda con sus consejos para la estandarización de la fertilización, así como por habernos brindado algunos medios sin los cuales no hubieramos podido obtener tan rápido algunos de los resultados.**

**A EVE por su apoyo con reactivos y/o material y por ser orejas a mis problemas personales cuando necesite de alguien que me escuchara muchas GRACIAS, te quiero mucho.**

**A las secretarías Lucerito y a Blanquita, por su apoyo, ayuda y amistad durante la realización de esta tesis.**

**A mis compañeros de laboratorio: Manuel, Sandra (sandy panda), René, Norma y Juan, por su compañía y amistad durante mi estancia en el laboratorio, y a Antonieta cote Velez, por su amistad y por sus consejos y ayuda durante la elaboración de mi tesis, GRACIAS.**

**A Victor Ramón Cortez, por su colaboración en la elaboración de esta tesis, ya que cuando hacia falta algo que me pudiera frenar (material de laboratorio) en mi trabajo, el veía la forma de conseguirme lo que necesitara y por su apoyo.**



A mis queridísimos (as) cuates, amigos, hermanos de carrera, Jose Luis (cocho), Ricardo, Edgar, Luisa Cruz<sup>2</sup>),(guicha), Flavio (el ingeniero colado alias flavonoide, Cristian-Brenda, Liliana Campos, Doris, Karla, Ere, a Jorge, y los que se me pase por el momento mencionar, un millón de gracias los quiero a todos.

A todos los compañeros de la maestría (adrian, ene, naty, adriana, , pedro, gabriela, ivonne, rocio, mario ivan, edgar ivan, Katia, erika, laura, a m,i clan: araceli (aaaayyy), laura arreola, carmen y elma) por su amistad, compañía y por brindarme parte de sus conocimientos.

## **A mis padres y Familia en general**

**Jerónimno López Mendiola  
Quirina Alcantar Gonzales**

**Esta hoja va dedicada a mis padres que día con día han sido parte de mis logros y mis fracasos, por su invaluable apoyo tanto moral como económico, pero sobre todo por la confianza que siempre tuvieron para conmigo en desmedida, a mi padre por su apoyo desmedido en la posibilidad de sus recursos, pero mas que nada por sus consejos a seguir adelante en los momentos mas difíciles, a mi madre que siempre estuvo y esta al pendiente (al igual que mi padre), de todo lo que pasa a mi alrededor por esperarme a que llegara y por parase a despedirme cuando me iba a la escuela, a mis hermanos que al igual que mis padres siempre estaban al pendiente de cómo me iba y me va. Mil GRACIAS por todas y cada una de sus atenciones, los quiero a cada uno de ellos.**

**A mi ti Jesus por apoyarme y preocuparse de mi avance igualmente a mis primos.**

**Para mi gran amor**

**A Tais Nopal Guerrero, ahora mi esposa por su apoyo, y  
consejos que fueron y han sido de gran ayuda durante los  
momentos más difíciles, y por ser portadora de mi gran  
felicidad, TE AMO BEBE.**

**Este trabajo, fue realizado en el laboratorio de Biología de la Reproducción del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV-IPN, bajo la dirección de la Dra. Adela Mújica Miranda y el Dr. Enrique Othon Hernández González**

**ESTE AGRADECIMIENTO ES PARA CONACYT, POR EL APOYO  
ECONÓMICO BRINDADO DURANTE LA ELABORACIÓN DE ESTA  
TESIS; EL APOYO PROVINO DEL PROYECTO NÚMERO 29283-B,  
GRACIAS.**

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>Met II</b>	<b>Metafase de la segunda división meiótica</b>
<b>RC</b>	<b>Reacción cortical</b>
<b>MP</b>	<b>Membrana plasmática</b>
<b>GCs</b>	<b>Granulos corticales</b>
<b>RE</b>	<b>Reticulo endoplasmico</b>
<b>EPV</b>	<b>Espacio perivitelino</b>
<b>ZP</b>	<b>Zona pelucida</b>
<b>EGC</b>	<b>Envoltura de los gránulos corticales</b>
<b>CRT</b>	<b>Calreticulina</b>
<b>MAI</b>	<b>Membrana acrosomal interna</b>
<b>MAE</b>	<b>Membrana acrosomal externa</b>
<b>RA</b>	<b>Reacción acrosomal</b>
<b>Gal-T</b>	<b><math>\beta</math>1,4-galatosiltransferasa</b>
<b>IP<sub>3</sub>R</b>	<b>Receptor a inositol trifosfato</b>
<b>LTe</b>	<b>Linfocitos T citotóxicos</b>
<b>NLS</b>	<b>Secuencia de localización nuclear</b>
<b>RS</b>	<b>Reticulo sarcoplasmico</b>
<b>IFI</b>	<b>Inmunofluorescencia indirecta</b>
<b>PMSG</b>	<b>Gonadotrofina sérica de yegua preñada</b>
<b>HCG</b>	<b>Gonadotrofina coriónica humana</b>
<b>BSA</b>	<b>Albúmina sérica bovina</b>
<b>MMT</b>	<b>Medio modificado de Tyrode</b>
<b>BWW</b>	<b>Biggers Withen Wittinghams</b>
<b>MCM-PL</b>	<b>Medio de cultivo mínimo-pirúvico-lactico</b>
<b>PBS</b>	<b>Buffer salino de fosfatos</b>
<b>CaM</b>	<b>Calmodulina</b>

## RESUMEN

Utilizando técnicas de doble tinción y microscopía confocal, Muñoz-Gotera *et al* 2002, colocalizaron a la calreticulina (CRT) en el interior de los gránulos corticales (GCs) y en los óvulos activados con zona pelucida, CRT permaneció en el espacio perivitelino y alrededor del cuerpo polar. Así, la incubación de los óvulos del hámster con la CRT exógena agregada al sistema antes de la incubación con los espermatozoides del cobayo, produjo una disminución del 80 % en la fertilización. Igualmente una disminución del 50 % en la penetración espermática se observó en un sistema de fertilización homóloga del ratón. Estos resultados nos permiten sugerir que la CRT participa en el bloqueo a la polispermia tanto en el sistema homólogo del ratón como en el heterólogo hámster-cobayo y que el mecanismo de acción de la CRT para bloquear la polispermia, ocurra por la unión de CRT con el sitio de fusión del óvulo con el espermatozoide, obstruyendo el receptor para el espermatozoide.

## INTRODUCCIÓN

### LA REACCIÓN CORTICAL Y LOS GRÁNULOS CORTICALES

En la mayoría de los mamíferos, el ovocito ovulado se encuentra en la metafase de la segunda meiosis (Met II), arrestado en esta etapa por reguladores del ciclo celular que incluyen a la proteína p34cdc2 cinasa, la ciclina B y el factor citostático (Nixon, V. y col. 2000). En el proceso de la fertilización, una vez que ha ocurrido la interacción entre las membranas plasmáticas (MP) de los gametos, el óvulo se activa y pocos minutos después se produce la exocitosis del contenido de los gránulos corticales del óvulo, en un proceso dependiente de  $Ca^{2+}$  conocido como la reacción cortical (RC) y cuya función principal es evitar la polispermia (Yanagimachi, 1994). La RC es parte del evento general de activación del óvulo, que también incluye la reanudación de la meiosis, la síntesis de macromoléculas y algunos cambios en el metabolismo del gameto (Goldenberg y Elinson, 1980). Así, la fertilización también induce eventos tardíos caracterizados por la inactivación de la cinasa p34cdc2 mediante la vía de degradación de la ciclina B activadora, lo que conlleva a la progresión del ciclo celular y por ende a la reanudación y terminación de la meiosis (Nixon V. *et al.*, 2000). Los gránulos corticales (GCs) son organelos citoplasmáticos de 200 a 600 nm de diámetro, recubiertos por membrana, los cuales se originan del aparato de Golgi durante el desarrollo folicular (Braden *et al.*, 1954; Szollosi, 1967; Gulyas, 1980; Cherr *et al.*, 1988; Wassarman 1988; Cran and Esper, 1990; Pierce *et al.*, 1992). Los gránulos aparecen en el ovocito durante su desarrollo temprano; sin embargo dependiendo de la especie, pueden aparecer en estadios más tardíos del desarrollo, en el hámster, mono y conejo se originan en ovocitos de folículos multicapas (Hope, 1965; Szollosi, 1967). En los ovocitos maduros en Met II, los GCs se localizan en la región cortical, a 2  $\mu$ m aproximadamente de la MP



(Cherr *et al.*, 1988; Pierce *et al.*, 1992; Laidlaw y Wessel, 1994; Hoodbhoy y Talbot, 1994). No toda el área subcortical contiene GCs, existe una zona libre de GCs localizada por encima del huso meiótico. El área carente de GCs aparece inicialmente en los ovocitos en metafase I, y gran parte de ella se pierde con el primer cuerpo polar; sin embargo esta área crece al entrar el ovocito en Met II. Luego de la ovulación el área libre corresponde a un 40% de la superficie cortical de los óvulos no fertilizados del ratón y a un 5% de los del hámster, lo que sugiere una posible exocitosis local y/o una redistribución lateral de los GCs (Ducibella *et al.*, 1988; Yanagimachi, 1994). Algunos autores estiman que hay entre 20-25 GCs/ 100  $\mu\text{m}^2$  de membrana plasmática (Cran *et al.*, 1988) o entre 3800 y 4700 GCs en cada óvulo del hámster (Okada *et al.*, 1986). Estos miles de gránulos distribuidos debajo de la corteza, comienzan a decrecer en número a las 6 horas y desaparecen a las 18 horas post ovulación en el hámster. Esta distancia en los ovocitos en Met II es sumamente importantes, ya que permiten que el tiempo de translocación de los GCs antes de la exocitosis sea corto. Además, su cercanía con el retículo endoplasmático (RE) favorece el rápido incremento del calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) intracelular, del cual depende la exocitosis y aumenta la eficiencia de la misma garantizando la completa liberación del contenido de los gránulos (Ducibella *et al.*, 1994; Yanagimachi y Chang, 1961). También la densidad de los GCs es variable y se propone que dicha variación se deba a diferentes estados de maduración (Gulyas, 1980; Wassarman, 1988); así mismo el número de GCs es variable, posiblemente debido a exocitosis prematura, con el objeto de separar las células de la corona radiada y la formación del espacio perivitelino (EPV), lo cuál facilitaría la incorporación espermática (Yanagimachi, 1994).

Se han identificado diversos componentes de los GCs (Tabla 1), de los cuales muchos se han descrito como constituyentes de estos debido a que han sido localizados en el medio extracelular de los óvulos activados. Entre los componentes de los GCs, podemos mencionar los siguientes: 1) Las proteasas de los GCs del ratón y del hámster, las cuales modifican a las glicoproteínas de

la zona pelucida (ZP) (Cherr *et al.*, 1988; Moller y Wassarman, 1989; Ducibella *et al.*, 1990; Hoodbhoy y Talbot, 1994; Ducibella, 1996). 2) Doce glicoconjugados que han sido detectados con lectinas en los óvulos no fertilizados del hámster. Nueve de ellos se localizan en la envoltura de los gránulos corticales (EGC), en la ZP y/o en la membrana plasmática luego de la fertilización (Hoodbhoy y Talbot, 2001). La EGC, es una matriz granular que se forma en el EPV luego de la RC, y la cual está constituida principalmente por componentes de los GCs (Dandekar, P. *et al.*, 1992). 3) Las proteínas de 32, 56, 62 y 75 kDa (Pierce *et al.* 1990; Gross V *et al.*, 2000; Hoodbhoy *et al.*, 2000). A las proteínas p56 y p62 se les atribuye un papel en la embriogénesis temprana y en la preimplantación (Hoodbhoy *et al.*, 2000, 2001); mientras que la función de la p75 y de la p32 todavía no ha sido aclarada (Pierce *et al.*, 1992; Gross V. *et al.*, 2000). 4) La  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa y a la ovoperoxidasa (ambas han sido localizadas citoquímicamente en los GCs de los ovocitos del ratón). Apparently actúan a nivel de la ZP donde se piensa que bloquean la polispermia al remover residuos específicos de carbohidratos (*O-linked*), involucrados en la unión de los gametos (Miller *et al.*, 1993), o bien endurecen a la ZP (Gulyas, 1980). El último componente proteico, localizado dentro de los gránulos corticales y detectado con técnicas de inmunofluorescencia y microscopía confocal es la calreticulina (CRT) (Muñoz-Gotera *et al.*, 2001). La CRT ha sido localizada en el espacio perivitelino luego de la activación de los óvulos y se sugiere que podría participar en el bloqueo a la polispermia.

**TABLA 1. COMPONENTES DE LOS GRANULOS CORTICALES.**

Componente	Especie estudiada	Referencia
$\alpha$ -D-manosa, $\alpha$ -D-NacGal y residuos de galactosa	Hámster, Ratón y Gata	Cherr <i>et al.</i> ,1988; Hoobdhoy y Talbot, 1993 a, b y 1994; Ducibella <i>et al.</i> , 1988.
Proteasa de serina	Ratón y hámster.	Gwatkin <i>et al.</i> ,1973; Moller y Wassarman, 1989, Ducibella <i>et al.</i> , 1990, 1996; Hoobdhoy Talbot, 1994
Proteína placentar que se une a heparina	Hámster	Sinosich <i>et al.</i> , 1990a,1990b Hoobdhoy Talbot, 1994.
$\beta$ -N-acetilglucosaminidasa	Ratón	Hoobdhoy y Talbot, 1993
Ovoperoxidasa	Ratón	Hoobdhoy y Talbot 1994
Proteína de 75 kDa	Ratón	Pierce <i>et al.</i> , 1990; 1992
Proteínas de 56 y 62 kDa	Hámster	Hoobdhoy <i>et al.</i> , 2000
Proteína de 32 kDa	Ratón	Gross V. <i>et al.</i> , 2000
Calreticulina	Hámster	Muñoz-Gotera <i>et al.</i> , 2001

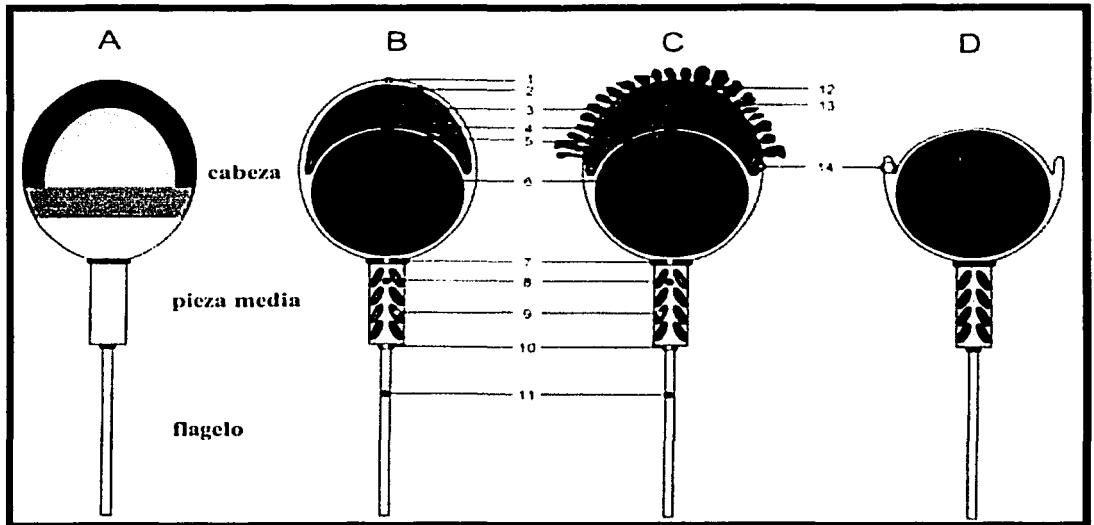
## LA REACCIÓN ACROSOMAL Y EL ACROSOMA

La cabeza del espermatozoide de los mamíferos contiene el núcleo y el acrosoma, rodeado por cantidades moderadas de citoplasma y componentes del citoesqueleto (Eddy, E. 1988).

El acrosoma es una estructura espermática vesicular parecida a un capuchón, que cubre la porción anterior del núcleo. En los mamíferos euterios, el tamaño y la forma del acrosoma varía de una especie a otra (Fawcett, 1975).

El acrosoma consiste de una membrana continua, de la cual la región cercana al núcleo recibe el nombre de membrana acrosomal interna (MAI), mientras que la adyacente a la membrana plasmática, se llama membrana acrosomal externa (MAE). La matriz o contenido acrosomal, está compuesto por una serie de enzimas hidrolíticas como: la acrosina, la hialuronidasa, las fosfolipasas A y C, la catepsina D, la acetilglucosaminidasa, entre otras. Por esta razón, el acrosoma es considerado un análogo de los lisosomas. En la reacción acrosomal (RA) el espermatozoide pierde casi todo el acrosoma (Yanagimachi, 1994). La RA es una excitosis regulada dependiente de  $Ca^{2+}$  externo y es el último proceso que lleva a cabo el espermatozoide antes de estar habilitado para fertilizar al óvulo (Yanagimachi y Usui, 1974). La RA consiste en la fusión en múltiples sitios, de la MAE con la MP de la región acrosomal, esto produce pequeños orificios por donde se libera parte del contenido acrosomal (Barros y Austin, 1967; Nagae *et al.*, 1986). Las membranas fusionadas dan lugar a una serie de vesículas mixtas que se separan del espermatozoide y el contenido acrosomal es liberado al medio externo ( Peterson *et al.*, 1978). Como consecuencia de la RA, sólo una porción de la MAE, correspondiente al segmento ecuatorial, permanece en su sitio y se fusiona con la MP, esto permite la continuidad de la MP con la membrana acrosomal y mantiene al espermatozoide sellado (Bedford, 1970).

La RA tiene dos propósitos: 1) Ayudar al espermatozoide a penetrar a través de las envolturas del óvulo (células de la granulosa y la ZP), mediante la liberación de enzimas y 2) Reorganizar la MP a nivel de la región ecuatorial, para formar el nuevo dominio de reconocimiento con el óvulo (Yanagimachi, 1994), Figura 1.



**Figura 1. Modelo de la reacción acrosomal en el espermatozoide.** 1: membrana plasmática; 2: membrana acrosomal externa; 3: contenido acrosomal; 4: membrana acrosomal interna; 5: envoltura nuclear; 6: núcleo de DNA altamente condensado; 7: anillo posterior; 8: pieza media; 9: mitocondria; 10: anillo anular; 11: flagelo; 12: vesícula media; 13: secreción acrosomal; 14: nuevo dominio (tomado de Frits *et al.*, 2000).

Otras características que presenta el espermatozoide que ha llevado a cabo la RA y que se relacionan con su capacidad fertilizante, son: 1. Aumento en la motilidad o hipermotilidad; 2. Un traslado o relocalización de proteínas (Aguas y Pinto da Silva, 1989; Primakoff *et al.*, 1987; Trejo y Mújica., 1990) y 3. La activación de proteasas, que intervienen en la interacción del espermatozoide con el óvulo (Cowan *et al.*, 1987; Villarroya and Scholler, 1987; Phels *et al.*, 1990).

En muchos mamíferos, el espermatozoide necesita unirse a la glicoproteína ZP3 de la ZP para llevar a cabo la RA, pero en el hámster, el cobayo y el bovino, la RA también es inducida por la heparina o el condroitín sulfato presentes en el *cumulus oophorus* (Suárez *et al.*, 1985; Yudin *et al.*, 1988).

## LA FERTILIZACIÓN

La fertilización involucra la fusión del espermatozoide con el ovocito. Esta fusión restaura el genoma diploide, activa al ovocito e inicia el desarrollo embrionario. La fertilización incluye eventos como: 1) la maduración de los gametos, 2) el transporte regulado de espermatozoides, 3) el reconocimiento del huevo y el espermatozoide, 4) la penetración de la zona pelúcida (ZP) por el espermatozoide y 5) la fusión óvulo-espermatozoide. La preparación final del espermatozoide involucra la capacitación y la adquisición de un estado de motilidad hiperactivo, así como la expresión de ligandos adhesivos para el óvulo al ocurrir la RA. La unión del espermatozoide capacitado a las glicoproteínas de la ZP es un evento específico de especie, que conlleva a la reacción acrosomal (RA) (Wassarman, P, 1987; Yanagimachi, *et al.*, 1994).

Desde el punto de vista experimental, tenemos dos tipos de fertilización: el modelo homólogo y el heterólogo. El primero está basado en la utilización de gametos (masculino y femenino) de la misma especie, está regulado por los controles especie-específico, como el reconocimiento de receptores a nivel de la ZP y de la MP. Este modelo, asemeja más las condiciones *in vivo* de la fertilización, pero necesita medios de cultivo especiales. En cuanto al sistema heterólogo, el gameto femenino más utilizado es el óvulo del hámster, debido a su fácil manejo y su alta penetrabilidad de la MP. La fusión de los óvulos del hámster libres de ZP con los espermatozoides humanos con RA (HPA), es el ensayo más ampliamente usado para las pruebas fisiológicas de fusión. HPA ha

mostrado que tiene una excelente correlación con la fertilidad de espermatozoides humanos *in vivo* e *in vitro* (Margalioth *et al.*, 1986). Un criterio positivo de fertilización es la observación de las cabezas espermáticas en el interior del óvulo, luego de 3 horas de incubación. Este ensayo es usado para predecir fallas de fertilidad de los espermatozoides.

## LA ZONA PELÚCIDA

Es una matriz extracelular glicoproteica, que se localiza entre la membrana plasmática y las células de la granulosa la cual aparece y se incrementa durante el desarrollo del ovocito (Yanagimachi, 1994). La ZP es la responsable de la especificidad, de especies observada durante la fertilización *in vitro*, debido a que contiene los receptores que pueden reconocer a los espermatozoides de la misma especie (Wassarman, 1990). La fertilización puede ser llevada a cabo sin la presencia de la ZP, pero su presencia es imprescindible en el desarrollo embrionario y la preimplantación *in vivo* (Yanagimachi, 1994), ya que la ZP protege a los ovocitos y a los embriones de daño físico. En el ratón la ZP de un óvulo mide 7  $\mu\text{m}$ , tiene 3 ng de proteínas y es permeable a grandes macromoléculas y pequeños virus (Yanagimachi, 1994).

La ZP del ratón está compuesta por 3 glicoproteínas, ZP1 (185- 200 kDa), ZP2 (120-140 kDa) y ZP3 (83 kDa) (Greve *et al.*, 1985). La ZP del hámster tiene también 3 glicoproteínas, ZP1 ( 200-240 kDa), ZP2 ( 150 kDa) y ZP3 (56-80 kDa) (Moller *et al.*, 1990, Wassarman, 1990). Para llevar a cabo la RA, el espermatozoide debe unirse a oligosacáridos de la ZP3 (Florman y Wassarman, 1985). El receptor espermático mejor estudiado, es el  $\beta$ 1,4-galactosiltransferasa (Gal-T). La mayor parte de Gal-T está confinada al aparato de Golgi, donde ocurre la biosíntesis de glicoconjugados, una menor cantidad es expresada en la superficie de la MP, donde la Gal-T participa como un receptor de ligandos

extracelulares de azúcares (Evans *et al*, 1995). Gal-T es expresada como una proteína integral de la MP en la región anterior del espermatozoide del ratón ( Shurr y Neely, 1988). La unión del espermatozoide a ZP3 desencadena la RA a través de la agregación de la molécula de Gal-T y la activación en cascada donde está involucrada una proteína G heterotrimérica (Macek *et al.*, 1991).

## **BLOQUEO A LA POLISPERMIA**

Son tres los mecanismos antipolispermicos actualmente descritos:

1. Un bloqueo a nivel de la membrana plasmática, debido a hiperpolarizaciones recurrentes, ocasionadas por el espermatozoide y que originan el potencial de fertilización (Miyazaki e Igusa, 1981).

2. Modificaciones de las glicoproteínas de la zona pelúcida (ZP) que dan lugar al endurecimiento de ella y se define como la reacción de la zona misma (Yanagimachi, 1994).

3. Un bloqueo a nivel de la superficie celular (Cherr *et al*, 1988; Steward-Savage y Bavister, 1988), donde en el espacio perivitelino se forma la EGC (Dandekar *et al*, 1992; Hoodbhoy *et al*, 1994, 2000, 2001).

## **LA CALRETICULINA (CRT)**

Fue descubierta por Mc Lennan en el 1972 como una proteína del retículo sarcoplásmico que une  $Ca^{2+}$ . Desde entonces ha recibido cuando menos 7 diferentes nombres (Ostwald y Mac Lennan, 1974; Macer y Koch, 1988; Damiani *et al*, 1988; Peter *et al*, 1992), por ejemplo: calregulina (Waisman *et al.*, 1985) o Erp60 (Lewis *et al.*, 1985). CRT tiene un peso molecular de 46 kDa y tiene una migración anómala en SDS-PAGE (Mr de 60-63 kDa)



(Waisman *et al.*, 1985 y Milner *et al.*, 1991), y a pH neutro su migración es de 55 kDa (Ostwald *et al.*, 1974 y Michalak *et al.*, 1980), esta migración variable es atribuida a su bajo punto isoeléctrico (4.14) (Mc Lennan *et al.*, 1983). CRT es codificada por un solo gen, compuesto por 9 exones de 3.6 kb o 4.6 kb para el DNA genómico del humano y del ratón, respectivamente y 8 intrones (Michalak *et al.*, 1992, 1999).

En la periferia de los hepatocitos de las ratas se localizan, la CRT, la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  (SERCA 2b), y el receptor a inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$  R) (Lievremont *et al.*, 1996). En esta zona rica en RE, la CRT interacciona tanto con  $\text{IP}_3$  R como con la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  (Camacho y Lechleiter, 1995) y dentro del RE, la CRT une la mitad del contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  (Meldolesi *et al.*, 1996). La CRT también ha sido localizada en otros compartimientos celulares, como el núcleo (Nash *et al.*, 1994), el acrosoma de las espermátidas y de los espermatozoides maduros de la rata (Nakamura *et al.*, 1993) y en el lumen de los gránulos de los linfocitos T citotóxicos (LTc). Usando doble marcaje se observó que CRT se asocia en los gránulos de los LTc a perforina y cuando se activa el linfocito, se detecta que la CRT se libera junto con las grazimas A y D al exterior de la célula. Se propone que la CRT pueda regular los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en los gránulos de los LTc y regular la activación de perforinas o servir como chaperona de éstas (Dupuis *et al.*, 1993). Andrin *et al.*, (1998) localizaron a la CRT en los LTc y en otras células relacionadas con el sistema inmunológico, en los gránulos de las células "Natural Killer". También se ha observado liberación de CRT en neutrófilos activados (Eggleton, P. *et al.*, 1994; Kishore, U. *et al.*, 1997).

No se conoce el mecanismo por el cual la CRT se interioriza en los gránulos, pues teóricamente debería estar retenida en el RE debido a la presencia de su secuencia KDEL para fijarse al RE. Los mecanismos propuestos para explicar la interiorización son: 1) que existan receptores a KDEL en los gránulos de los LTc, 2) que exista una peptidasa que corte la secuencia KDEL

de la CRT, 3) que los receptores a KDEL, en RE se saturan y 4) que existan dos formas de CRT, con diferentes señales de tráfico y que la característica de una de ellas le permita moverse al interior de los gránulos (Dupuis *et al*, 1993).

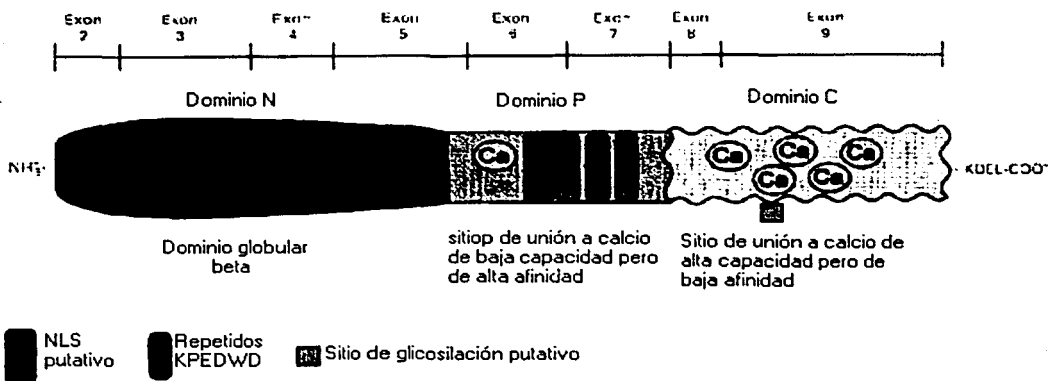
En cuanto a la estructura de la CRT (modelo 1), se sabe que tiene de 20 a 25 sitios de baja afinidad y alta capacidad de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  (Meldolesi *et al*, 1996). Estudios del cDNA revelaron que tiene 416 aa incluyendo la secuencia señal de 17 residuos en la región  $\text{NH}_2$  terminal (Nakamura *et al*, 1993). Los análisis estructurales de la secuencia de aminoácidos (aa) indicaron que la CRT puede ser dividida en al menos tres dominios diferentes (Nash *et al*, 1994):

1. El dominio amino terminal (N) que forma bandas  $\beta$  plegadas antiparalelas y tiene un motivo hélice-vuelta-hélice. En la CRT recién sintetizada hay una secuencia señal diferente de KDEL, para el RE. El dominio N no muestra homología con otras familias de proteínas, pero es muy conservado entre los miembros de la familia de las CRT. Gracias a este dominio, puede llevar a cabo una interacción proteína-proteína pues hay un sitio en él, que se une al péptido sintético KLGFFKR de la subunidad  $\alpha$  de la integrina y además interactúa con el dominio de unión a DNA de los receptores esteroideos. Este dominio, rico en histidinas y cisteínas, parece unir zinc aunque no contiene consenso de dedo de zinc (Nash *et al*, 1994). Se sugiere que el dominio  $\text{NH}_2$  terminal de la CRT puede estar involucrado en la iniciación de la transcripción del receptor de la hormona esteroidea (Camacho, P. y Lechleiter, 1995).

2. Un dominio intermedio de CRT, denominado P es rico en prolina, presenta tres secuencias repetidas de 17 aa (PXXIXDPDAXKPEDWDE). Esta secuencia de aa es altamente conservada en todas las especies. Dos de los tres repetidos (KPEDWD) se han encontrado en calnexina, una proteína de la membrana del RE con función de chaperona. El dominio P une 1 mol de  $\text{Ca}^{2+}$ / 1 mol de proteína, con una  $K_d$  de 400  $\mu\text{M}$  indicando que es de alta afinidad a

Ca<sup>2+</sup> y de baja capacidad. Su función en la regulación de Ca<sup>2+</sup> es todavía desconocida (Camacho P. y Lechleiter, 1995). Se predice que el dominio P con tres repetidos forma un "motivo" hélice-vuelta-hélice similar al "EF hand" característico de las proteínas que unen Ca<sup>2+</sup>. El dominio P tiene una secuencia de localización nuclear (NLS) (Nash *et al*, 1994).

3.- El dominio carboxilo terminal (C), es ácido, tiene 37 residuos ácidos y une Ca<sup>2+</sup> con baja afinidad y alta capacidad. Puede representar el sitio de almacenamiento de Ca<sup>2+</sup> pues une más de 25 moles de Ca<sup>2+</sup>/ mol de proteína. Además, esta región tiene un sitio potencial de glicosilación en el residuo 326 a un lado de la secuencia KDEL e interacciona *in vitro* con el RE y con el retículo sarcoplásmico (RS), así como con los factores de coagulación sanguínea 9 y 10 y protrombina, por lo que puede ser responsable de la actividad antitrombótica de la CRT. El extremo carboxilo es la región de las CRT que tiene mayor divergencia en su secuencia de aa (Nash *et al*, 1994)



Modelo 1. Estructura de la calreticulina (tomado de Michalak, M. *et al*, 1992).

**Funciones de la CRT.** Un suero anti CRT inhibió la motilidad del espermatozoide en la fertilización *in vitro* de óvulos de ratón y se sugirió una función en la reacción acrosomal (Nakamura *et al*, 1992,1993). La CRT como la calnexina son proteínas clave en la selección de proteínas estructuradas adecuadamente y que van a ser transportadas del RE al aparato de Golgi (Meldolesi *et al*, 1996; Ikawa *et al*, 1997). La CRT, la calsecuestrina, el receptor a rianodina y el  $\text{InsP}_3$  R están involucrados en la iniciación y propagación de la onda de  $\text{Ca}^{2+}$  en huevos del erizo de mar (Shen y Buck, 1993). En estudios de células B16 de melanoma de ratón se han encontrado dos isoformas: la endocalreticulina y la ectocalreticulina. La endocalreticulina tiene 52 kDa y se une a los tallos citoplasmáticos de la  $\alpha$  integrina; el papel propuesto para esta isoforma es el de mantener a las integrinas listas para contactar con su ligando cuando las células B16 se unen a la laminina. En cuanto a la ectocalreticulina, ésta es de 62 kDa, se biotinila en la superficie, se ancla por la secuencia KDEL al receptor KDEL de la membrana plasmática y coopera con la integrina  $\alpha 6\beta 1$  disparando la expansión celular, pues por sí sola la isoforma no puede favorecer este evento. El complejo integrina-CRT funciona en forma simbiótica transmitiendo información a través de la membrana plasmática (Zhu *et al.*, 1997). Coppolino y col. (1997), indicaron que CRT es un modulador esencial tanto de las funciones adhesivas de integrinas como de la señalización iniciada por integrinas. Se ha visto que CRT se une al péptido KLGFFKR, esta secuencia se ha encontrado en el "motivo" de unión a DNA de las hormonas esteroideas, tiroideas y el receptor del ácido retinoico (Collins *et al*, 1989). CRT interacciona con los dominios de unión a DNA del receptor a glucocorticoides, lo cual previene que los receptores interactúen con su elemento responsivo (Van Den Berg *et al*, 1990). Además de unir  $\text{Ca}^{2+}$ , CRT une 14 mol de  $\text{Zn}^{2+}$ /mol de proteína (Khanna *et al.*, 1987), la unión a  $\text{Zn}^{2+}$  causa cambios conformacionales dramáticos en la proteína (Khanna *et al.*, 1986). Aunque no está establecido que CRT se

glicosile, hay evidencias que apoyan esta sugerencia: CRT tiene un sitio para glicosilación en el aa 326; además, se ha observado que CRT se une a sefaroasa acoplada a Con A (concanavalina A) y es sensible a endoglicosilasa H (Waissman *et al*, 1985); por otra parte, CRT en hígado de rata tiene un complejo híbrido de oligosacáridos y una galactosa terminal (Van *et al*, 1989). También se ha encontrado que CRT tiene un sitio de reconocimiento para fosforilación por PKC y uno para la cinasa de tirosina (Michalak, *et al*, 1992); así como dos señales dirigidas a lisosomas en los residuos 42-48 y 347-353 (McCauliffe *et al*, 1990).

Se han encontrado proteínas relacionadas directa o indirectamente con CRT. En erizo de mar se encontró una glicoproteína parecida a calsecuestrina (CSLP) con un peso molecular de 58 kDa y se sugiere que corresponda a la CRT del hígado (Treves *et al*, 1990; Lebeche y Kaminer, 1992). Un suero contra calsecuestrina cruza con CRT, lo que sugiere alguna homología entre ellas (Parys *et al*, 1994). Calmegina es chaperona de algunas proteínas de la superficie de los espermatozoides que median la interacción con el óvulo. Es parecida a CRT, se requiere para la fertilización y su ausencia se asocia a esterilidad. Calmegina se une a los polipéptidos sintetizados durante la espermatogénesis e interviene en el "control de calidad" de las proteínas que van a salir del RE (Ikawa *et al*, 1997). La CRT, tiene un 58% de homología con calnexina (Watanabe D. *et al*, 1994), ésta es una proteína integral de la membrana del RE que también une  $Ca^{2+}$ . La región de mayor similitud se encuentra en el dominio P, donde dos de los tres repetidos son iguales (Nash *et al*, 1994). El RE de las células espermatozoides tiene una proteína singular de unión a  $Ca^{2+}$ , la calnexina-t, la cual parece ser una variante de la calnexina (Ohsako, S. *et al*, 1994). Investigaciones recientes han demostrado que la CRT está localizada en los GC de los óvulos del hámster, que se exocita durante la RC y que se relocaliza en el espacio perivitelino (Muñoz-Gotera *et al*, 2001).

## **sp50**

El grupo de trabajo de la doctora Adela Mújica Miranda, purificó una proteína de 50 kDa (sp50) del testículo del cobayo mediante una técnica para el aislamiento de anexinas. Los estudios de inmunofluorescencia indirecta (IFI), revelaron que sp50 se localiza en la región acrosomal de los espermatozoides del cobayo, y que en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  se asocia a las membranas aisladas del espermatozoide (Muñoz-Gotera, R. 1998). Por otra parte en un modelo de espermatozoides permeabilizados del cobayo, al añadir sp50 al sistema estimula la exocitosis del acrosoma, o RA, en respuesta al calcio (Hernández *et al.*, 1996).

Muñoz-Gotera *et al.*, (2001), demostraron que sp50 y CRT son la misma proteína y que en los óvulos activados, esta proteína intragranular, se relocaliza en el espacio perivitelino, y forma parte junto con otros componentes de los GC, de la envoltura que rodea al óvulo luego de la RC.

Con base en los antecedentes señalados en este trabajo se plantearon los siguientes objetivos: 1) determinar el efecto de la CRT en la fertilización heteróloga y 2) determinar si la CRT tiene la misma participación en la fertilización homóloga.

## **HIPÓTESIS**

**Nuestra hipótesis de trabajo es: “La calreticulina constitutiva de los gránulos corticales y la cual es excitada en la reacción cortical, participa en el mecanismo de bloqueo a la polispermia”.**

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar si la calreticulina de los gránulos corticales que es excitada en la reacción cortical, participa en el mecanismo de bloqueo a la polispermia.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- 1.- Determinar cuál es el tiempo óptimo de capacitación de los espermatozoides de ratones de las cepas Balb/c y NMR-I.
- 2.- Valorar cuál es el medio de incubación más adecuado para lograr la reacción acrosomal en los espermatozoides de ratones de diferentes cepas.
- 3.- Determinar el efecto de la CRT sobre la fertilización heteróloga de los óvulos del hámster por los espermatozoides del cobayo.
- 4.- Determinar el efecto de la CRT sobre la fertilización homóloga del ratón.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **SUPEROVULACIÓN Y EXTRACCIÓN DE LOS ÓVULOS DEL HÁMSTER.**

Se utilizaron hembras de hámster dorado (*Mesocricetus auratus*) vírgenes, de 5-6 semanas de edad, a las cuales se les administró por vía subcutánea 35-40 UI de gonadotrofina sérica de yegua preñada (PMSG; Foligon, INTERVET) diluida en agua destilada estéril, seguida 56 horas más tarde de 35-40 UI de gonadotrofina coriónica humana (HCG; SIGMA), por la misma vía. Pasadas 15-17 horas de la inyección de HCG, se procedió al sacrificio por anestesia. Se extrajo quirúrgicamente el complejo ovario-oviducto-cuerno uterino, al cual se le retiró la grasa e irrigaciones arteriovenosas, utilizando para ello una tijera de microdissección y una pinza para microscopía electrónica # 4. Se localizó la ampolla oviductal y se puncionó ésta para extraer los óvulos rodeados por las células del cúmulus, este complejo celular se identificó por su apariencia de nube, la cual se aspiró con una pipeta Pasteur y se colocó en un portaobjetos excavado el cual contenía el Medio Modificado de Tyrode (MMT) (ver apéndice), complementado con 0.3% de albúmina sérica bovina (BSA).

### **SUPEROVULACIÓN Y EXTRACCIÓN DE LOS ÓVULOS DEL RATON.**

Se utilizaron hembras de ratón vírgenes de la cepa NMR-I, de 5-6 semanas de edad y de un peso promedio de 30 gramos, a las cuales se les administró por vía subcutánea 15-20 UI de gonadotrofina sérica de yegua preñada (PMSG; Foligon, INTERVET) diluida en agua destilada estéril,

seguida 48 horas más tarde de 15-20 UI de gonadotropina coriónica humana (HCG; SIGMA), por la misma vía. Pasadas 12-14 horas de la inyección de HCG, se procedió al sacrificio por anestesia en una cámara pre-gaseada con éter etílico. Mediante una incisión en V en la región abdominal, se extrajo quirúrgicamente el complejo ovario-oviducto-cuerno uterino y se siguió el procedimiento ya descrito para la obtención de los óvulos hámster, excepto que en esta especie se utilizó el medio M2 (ver apéndice).

### **OBTENCIÓN DE LOS ÓVULOS SIN SUS ENVOLTURAS**

Con el objeto de disgregar a las células de la granulosa que forman el *cúmulus oophorus*, a los óvulos se les adicionó hialuronidasa al 0.1% en el medio modificado de Tyrode (MMT) o en el medio M2 según el caso, y se tomó la precaución de retirar las células antes de los 7 minutos de tratamiento para evitar la activación prematura de los óvulos (Simerly y Schatten, 1993). El medio de cultivo fue suplementado o no con albúmina sérica de bovino (BSA) de acuerdo al destino experimental de los óvulos, los cuales se lavaron varias veces para retirar el exceso de la enzima. Enseguida, los óvulos se colocaron durante 50 segundos a 1 minuto en tripsina al 0.1% en medio de cultivo con el fin de eliminar la ZP, e inmediatamente después se adicionó el inhibidor de tripsina al 0.15% diluido en el medio de cultivo, esto en el caso de los óvulos del hámster; para los óvulos del ratón la ZP fue eliminada con medio ácido de Tyrode a pH 3 por 30-40 segundos, seguido de varios lavados con el medio M2 para eliminar el exceso del Tyrode ácido; en algunos experimentos se utilizaron los óvulos con la ZP presente. Para el manejo de los óvulos se utilizó el microscopio estereoscópico (Reichert 580 X1 a X6).

## **OBTENCIÓN, CAPACITACIÓN Y VALORACIÓN DE LA REACCIÓN ACROSOMAL DE LOS ESPERMATOZOIDES DEL RATON.**

Se utilizaron machos adultos Balb/c y NMR-1 de 12-16 semanas de edad, que no se hubiesen apareado los 3 días previos al experimento ni por más de 7 días, los cuales se sacrificaron por anestesia (ya descrita). A través de una incisión en V en la región abdominal baja se acceso quirúrgicamente a la cavidad abdominal para extraer el complejo testículo-epidídimo-conducto deferente, éste previamente ligado en su extremo distal. Con una pinza fina se retiraron las irrigaciones arteriovenosas y se cortó el conducto ligado en su unión con el epidídimo. Las células se extrajeron por perfusión del conducto deferente (2 ml), para lo cual se utilizaron 3 diferentes medios de capacitación, M16, BWW y MCM-PL. La suspensión celular se centrifugó a una velocidad de 600 g por tres minutos y la pastilla de espermatozoides se resuspendió nuevamente en 2 ml del medio utilizado para un nuevo lavado. Finalizado éste, se eliminó por aspiración con una jeringa el sobrenadante, las células se ajustaron a una concentración de  $5 \times 10^6$ /ml para su capacitación y se incubaron durante 1 hora 20 minutos. Para verificar si 1 hora 20 minutos era el tiempo apropiado de capacitación en las muestras se valoró la RA (ver Fig. 4). Para ello, se tomó una muestra de 50-100  $\mu$ l y se colocó en 500  $\mu$ l de formaldehído al 3% en PBS durante 10 min. Los espermatozoides se lavaron con PBS tres veces por centrifugación a 9000 rpm durante 3 min cada vez. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 500  $\mu$ l de PBS. Finalizado este tiempo, se bloquearon los grupos aldehído residuales con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  50 mM en PBS durante 10 minutos y se realizaron tres lavados en PBS por centrifugación. Se prepararon frotis de la muestra espermática en portaobjetos previamente desengrasados por inmersión en una solución de acetona-alcohol etílico-cloroformo en relación 1:1:1. El frotis se dejó secar al aire toda la noche y se realizaron tres lavados en agua bidestilada por 10 min cada vez para remover el

exceso de sales. El frotis fue teñido según el método descrito por Larson y Miller (1999), quienes publicaron una técnica sencilla, rápida y económica, para visualizar por medio de la tinción con Coomassie G-250, el acrosoma de los espermatozoides de varias especies. Brevemente, se preparó una mezcla de Coomassie G-250 al 0.22%, en metanol al 50% y ácido acético glacial al 10%. Cada muestra permaneció en la mezcla de tinción por un tiempo máximo de 2 min, finalizados éstos inmediatamente se retiró el exceso de colorante con abundante agua bidestilada y se dejó secar al aire para ser evaluadas en un microscopio óptico (Zeiss-Jena MC 80). Se realizaron 2 frotis de cada muestra y se contaron 100 células por duplicado, para un total de 400 espermatozoides evaluados por muestra, se obtuvo el porcentaje promedio de espermatozoides con y sin acrosoma.

#### **OBTENCION Y CAPACITACION DE LOS ESPERMATOZOIDEOS DEL COBAYO.**

Se utilizaron cobayos machos de aproximadamente 700 g de peso los cuales se sacrificaron por dislocación cervical. Se realizó una incisión en la región abdominal baja para obtener el complejo testículo-epidídimo-conducto deferente, ligado en su extremo distal. Con una pinza fina se retiraron las irrigaciones arteriovenosas y se cortó el conducto ligado en su unión con el epidídimo. Luego de esto se perfundió con una cánula, 1 ml de solución de NaCl al 0.9 % a 37 °C. Las células se centrifugaron a una velocidad de 2500 rpm, 2 veces y por tres minutos. Finalizado este tiempo, se tomó una muestra de 25 µl de la suspensión espermática y se vaciaron en un tubo de ensayo que contenía 500 µl de Tritón X-100 al 0.1% en PBS. Para el conteo de los espermatozoides se utilizó una cámara de Neubauer. La concentración final se ajustó a  $35 \times 10^6$  espermatozoides / ml de MCM-PL (ver apéndice). Los espermatozoides permanecieron 2 horas en incubación en el medio para que se llevara a cabo la RA. Los parámetros que definieron el tiempo de incubación de los espermatozoides capacitados fueron, la observación de la RA; es decir, la

pérdida del acrosoma e hipermotilidad (Suárez *et al*, 1991 y Yanagimachi, 1994). La observación se realizó en un microscopio de campo claro (Zeiss-Jena MC 80).

## **FERTILIZACIÓN *IN VITRO* DE LOS ÓVULOS DEL RATÓN Y EFECTO DE LA CRT EN LA FERTILIZACIÓN HOMÓLOGA DEL RATÓN Y HETERÓLOGA HÁMSTER-COBAYO.**

Se obtuvieron los óvulos del ratón, de hembras inducidas a superovular. Las células obtenidas se resuspendieron e incubaron en el medio M16 (ver apéndice) (Hogan, B. *et al*, 1986). y se dividieron en dos grupos; el grupo A constituido por óvulos sin sus envolturas (ver obtención de óvulos sin envolturas) y el grupo B, conformado por óvulos donde sólo se retiraron las células de la granulosa, mediante la incubación por 5 minutos con hialuronidasa bovina a una concentración final de 0.1% en el medio M16 y donde se dejó lo más intacta posible la ZP. Luego de varios lavados para retirarles el exceso de la o las enzimas, según sea el caso, ambos grupos de óvulos fueron incubados con 5 ng de la proteína sp50 por 1 hora a 37 °C. Enseguida a los óvulos (20-25 óvulos/100 µl del medio) se les adicionó una capa de aceite mineral y fueron incubados con espermatozoides ( $2 \times 10^5$ /ml, concentración final), que estuvieron en capacitación durante 1 hora y 30 minutos (ver Obtención, capacitación y valoración de la reacción acrosomal de los espermatozoides del ratón), la co-incubación de los gametos se realizó por 4 horas a 37 °C en una cámara con 5% de CO<sub>2</sub>.

Para la fertilización *in vitro* de los óvulos del hámster se procedió de manera similar a la anterior con algunas modificaciones: 1) A los óvulos se les retiraron ambas envolturas, 2) el medio de incubación tanto para la extracción de los óvulos como para la fertilización fue el Medio Modificado de Tyrode MMT (ya descrito), y 3) la concentración de espermatozoides utilizada para la

fertilización fue de aproximadamente de  $4 \times 10^5$  espermatozoides/ml del medio. Transcurrido el tiempo de co-incubación (4 horas), se procedió a la fijación de los óvulos en paraformaldehído al 2% por 1-2 horas (ver resultados) a 4 °C. Con el propósito de garantizar que el efecto observado en la inhibición en un 80% de la fertilización era específico de la CRT y no del medio de almacenamiento de la proteína (Buffer de boratos), introdujimos un control con CAM, la cual como se mencionó en párrafos anteriores no es excitada en la RC, además el buffer en el cual se encontraba almacenada era el mismo de la CRT.

## **VALORACIÓN DE LA FERTILIZACIÓN.**

Para evaluar la ocurrencia de la fertilización, empleamos tres métodos

1. Tinción del DNA con el fluorocromo vital Hoechst 33342
2. Observación al microscopio óptico en contraste de fase de la presencia de los pronúcleos masculino y femenino.
3. Observación en contraste de fase de la primera división de segmentación.

Los óvulos incubados con los espermatozoides durante 4 horas, fueron lavados varias veces para quitar el exceso espermático. Los gametos se transfirieron al medio de cleavage (Sage, Biopharma, medio adecuado para favorecer el desarrollo embrionario) y se dejaron durante 18-24 horas en incubación en la incubadora con 5% de CO<sub>2</sub>. La observación se realizó en un microscopio óptico (ZEISS-Jena MC 80).

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los porcentajes de reacción acrosomal obtenidos para los diferentes medios y cepas, fueron determinados con una prueba no paramétrica MANOVA, reaves de la cual se pueden analizar la relación entre dos o mas variables independientes y dos o mas variables dependientes (Hernández R, Fernandez C y Baptista P, 2001) y una prueba de Tukey para poder discernir diferencias en y entre los medios, en el programa Sigma Plot Statistics (SPSS) (la significancia fue considerada  $P \leq 0.05$ ).

## **RESULTADOS**

### **VALORACIÓN DEL TIEMPO DE CAPACITACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES DE LOS RATONES Balb/c Y NMR-I EN TRES DIFERENTES MEDIOS**

En la introducción se mencionó que la capacitación es un evento previo e indispensable para que ocurra la RA (Fig.1) en los espermatozoides de los mamíferos. Con el propósito de determinar el tiempo de incubación requerido, para que en el espermatozoide del ratón se presente la RA, y por lo tanto indirectamente conocer el tiempo de capacitación, utilizamos la técnica de coloración del acrosoma con azul de Coomassie propuesta por Larson y Miller (1999), con algunas modificaciones (ver Materiales y Métodos). La figura 3A muestra el acrosoma teñido en azul, de los espermatozoides del ratón no capacitados y las figuras 3B es un espermatozoide que sólo conserva residuos de acrosoma, y corresponde a aquellos capacitados en los cuales está ocurriendo la RA y 3C es un espermatozoide que completo la RA. En las muestras analizadas de experimentos individuales (n=7), de la cepa Balb/c así como de la NMR-I, a un tiempo de incubación de 2 horas y 45 minutos, más del 65% de los espermatozoides carecían de acrosoma en el medio M16 (Fig. 4). Los espermatozoides Balb/c se capacitaban mejor que los espermatozoides NMR-I, en el medio MCM-PL. a 2 horas 45 minutos, a más de un 60% de los espermatozoides les había ocurrido la RA; mientras que sólo 40% de los espermatozoides NMR-I carecían de acrosoma (Fig. 4). En el medio BWW, la diferencia entre las dos cepas fue menor entre sí, en la cepa NMR-I, aproximadamente 52% de los espermatozoides perdieron el acrosoma y 50% de los espermatozoides Balb/c, carecían del organelo.

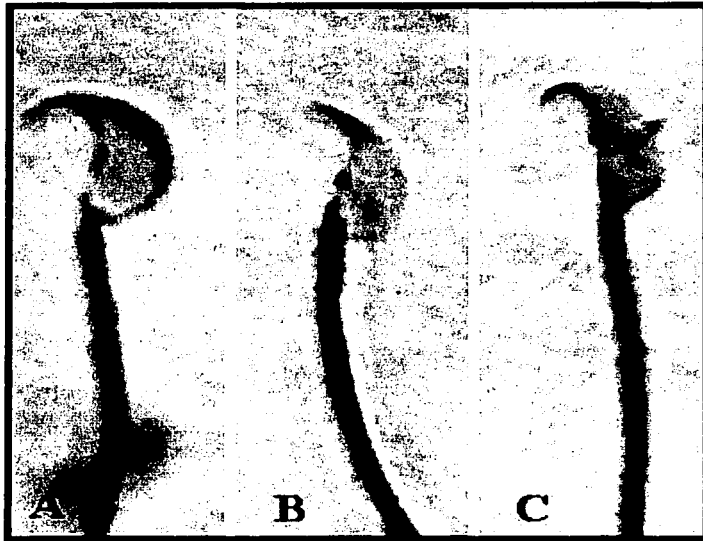


Por otro lado, cuando valoramos la reacción acrosomal (RA) expresada por ambas cepas, independientemente del medio de incubación en el que se capacitaron, encontramos un 72% de RA en los espermatozoides MNR-I y 60% de RA en los espermatozoides Balb/c (Fig. 5). Al analizar el efecto del medio sobre la RA independientemente de la cepa, encontramos el resultado siguiente. La RA es mayor en el medio M16 (30%), que en el MCM-PL (28%) y en este que en el medio BWB (20%) (Fig. 6). La Tabla 2 muestra que las diferencias si fueron significativas ( $p < 0.05$ ), tanto para la cepa como para el medio.

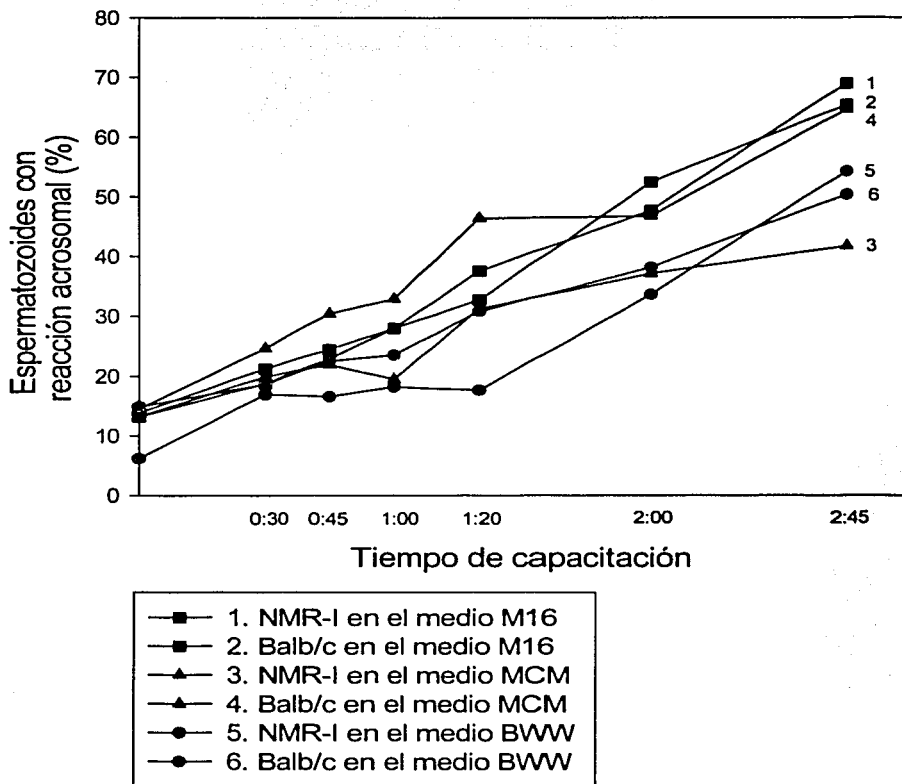
#### **ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA HABILIDAD DE LAS CEPAS DE RATÓN Balb/c y NMR-I PARA LLEVAR A CABO LA REACCIÓN ACROSOMAL.**

Realizamos un análisis estadístico con el propósito de determinar la relación entre la cepa, el medio capacitante y el tiempo de capacitación, con la presencia de la RA, para utilizarlo en ensayos de fertilización *in vitro*. Los resultados, presentados en la Tabla 2, muestran: A) que el tiempo es un factor indispensable, para que se lleve a cabo la capacitación; es decir, conforme el tiempo de incubación transcurre, el número de espermatozoides sin acrosoma va incrementándose; B) la RA es dependiente del medio de capacitación que se utilice (Fig. 6). El medio M16, podría decirse fue significativamente mejor que los otros 2 medios. Pruebas cualitativas (datos no mostrados), nos permitieron observar que en el medio M16, tanto la movilidad como la supervivencia de los espermatozoides, después de 1 hora 20 minutos, era mayor que en los otros 2 medios. Además, a las 2 horas 45 minutos de incubación en el medio M16 como indicamos arriba, casi el 70% de los espermatozoides ya habían sufrido la RA (condición indispensable para la fertilización). Así, los resultados señalaron al medio M16 como el mejor de los 3 medios valorados. Otra ventaja adicional

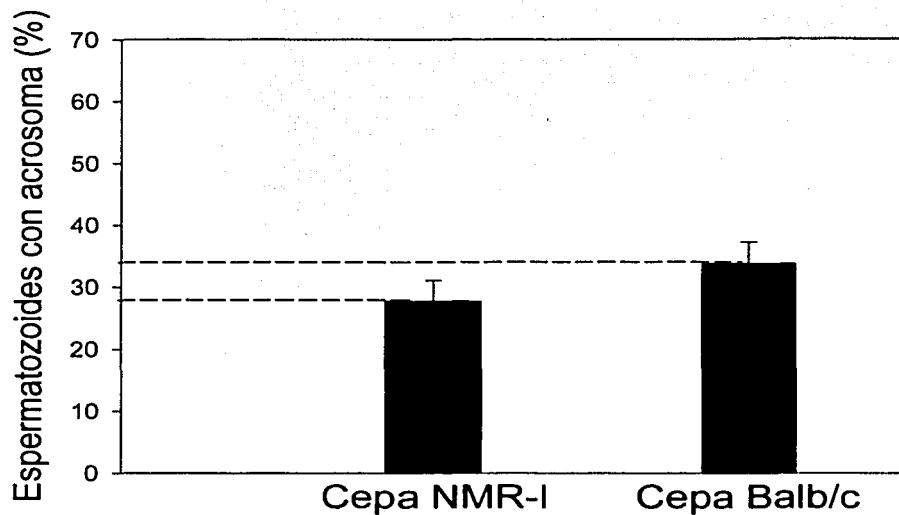
del medio M16 es que también puede ser empleado en la co-incubación de los gametos durante la fertilización, hecho que reduce la manipulación de los espermatozoides y el riesgo de dañarlos. C) la utilización de 2 cepas diferentes nos permitió diferenciar su capacidad de producción de la RA, que también fue significativamente diferente entre ellas (Fig. 5).



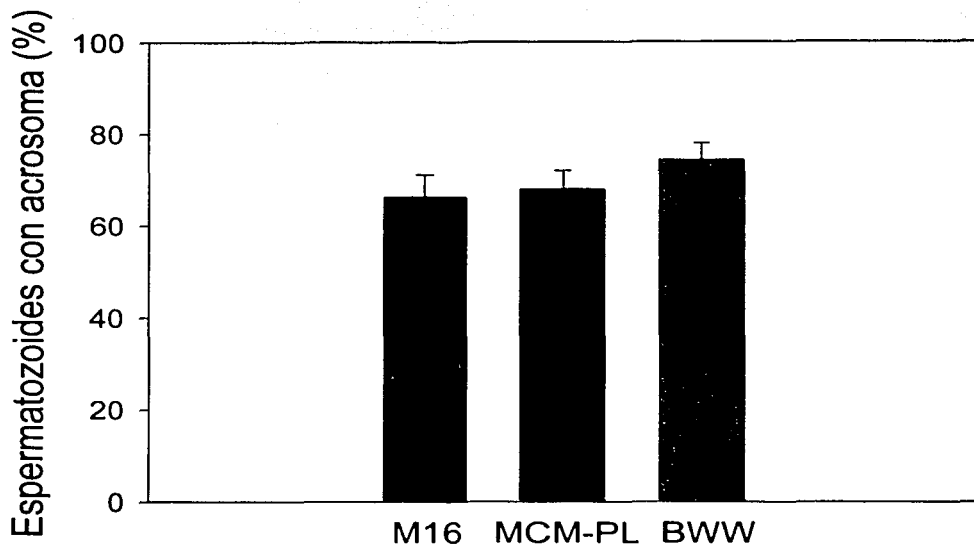
**Figura 3. valoración de la reacción acrosomal en los espermatozoides de ratón.** Espermatozoides no capacitados y capacitados durante 2 horas 45 minutos fueron fijados en formaldehído al 1 % durante 15 minutos y teñidos con azul de Coomassie (ver Materiales y Métodos). 3 A) espermatozoide no capacitado con su acrosoma intacto, teñido; 3 B) espermatozoide con reacción acrosomal parcial que muestra residuos del acrosoma; 3 C) espermatozoide carente de acrosoma (la reacción acrosomal fue completa).



**Figura 4. Efecto de los medios M16, MCM-PL y BWV sobre los espermatozoides de las cepas NMR-I y Balb/c, en la inducción de la (RA).** Los espermatozoides se extrajeron por perfusión de los conductos deferentes de ratones NMR-I y Balb/c. Para la perfusión se utilizaron 2 ml de uno de los 3 medios de capacitación señalados. Durante la incubación se tomaron muestras alicuotas de cada una de las incubaciones, se fijaron en formaldehído (3 %) y se tiñeron con azul de Coomassie G-250. Los espermatozoides con y sin acrosoma se contaron diferencialmente (400 por muestra), en frotis bajo microscopio de luz. Los datos mostrados son el promedio aritmético de espermatozoides sin acrosoma de 7 experimentos individuales.



**Figura 5. La reacción acrosomal en el espermatozoide del ratón, su dependencia de la cepa (NMR-I Balb/c).** Los espermatozoides de las cepas NMR-I y Balb/C se incubaron en los medios M16, MCM-PL y BWW y los porcentajes de RA se evaluaron a las 2 horas 45 minutos de la incubación capacitante (ver Materiales y Métodos). Los datos son el promedio  $\pm$  de los residuos en los 3 medios para cada cepa. La diferencia es estadísticamente significativa, con una  $p = 0.0313$  ( $p \leq 0.05$ ). La cepa NMR-I se capacita y tiene una RA mayor que la cepa Balb/c.



**Figura 6. Efecto de los medios M16, MCM-PL y BWW, sobre el proceso de la reacción acrosomal.** Los espermatozoides de las cepas NMR-I y Balb/c se incubaron en los 3 medios señalados. A las 2 horas 45 minutos de incubación se fijaron las muestras y se tiñeron sus acrosomas (ver Materiales y métodos). Al microscopio de luz y por conteo diferencial se cuantificó el número de espermatozoides que conservaron el acrosoma. Los datos corresponden al valor promedio de las 3 cepas con cada uno de los medios. porcentajes de RA, en el medio M16 > MCM-PL > BWW.

**Tabla 2. Análisis estadístico (multi ANOVA) de las variables tiempo, cepa y medio sobre la reacción acrosomal (RA).**

<b>Variables</b>	<b>Valor de significancia (p)</b>
<b>Tiempo</b>	<b>0.0000</b>
<b>Cepa</b>	<b>0.0313</b>
<b>Medio</b>	<b>0.0299</b>
<b>Cepa * Medio</b>	0.3014
<b>Tiempo * Cepa * Medio</b>	0.1975

Prueba de MANOVA que muestra el valor de significancia de las variables por separado e interacciones entre ellas sobre la reacción acrosomal  $p \leq 0.05$ .

**Tabla 3. Prueba de Tukey para comparaciones múltiples**

	M16	MCM	BWW
M16	1	0.864	<b>0.033</b>
MCM	0.0864	1	0.102
BWW	<b>0.033</b>	0.102	1

**Prueba de Tukey entre medios.**

Para valorar estadísticamente las diferencias o semejanzas entre los medios, realizamos una prueba de Tukey (tabla 3) y los resultados mostraron que el único medio que no mostró semejanza fue el medio BWW ( $p = 0.033$ ), con respecto a los medios M16 y MCM-PL. En la Figura 4, se puede ver que la diferencia de este medio con respecto a los otros 2 (M16 y MCM-PL) fue evidente por la poca RA que indujo sobre los espermatozoides.

## **VALORACIÓN DE LA FERTILIZACIÓN EN EL SISTEMA HOMÓLOGO Y HETERÓLOGO.**

Los óvulos del ratón con y sin ZP, así como los óvulos del hámster carentes de ZP fueron pre-tratados con 5 ng de CRT por 1 hora y enseguida inseminados respectivamente con espermatozoides capacitados del ratón y del cobaya para los óvulos del hámster (ver Materiales y Métodos).

### **1. Tinción del DNA con el fluorocromo vital Hoechst 33342**

Esta técnica fue empleada tanto en los óvulos del ratón como en los del hámster, que fueron inseminados por 4 horas. Los óvulos se fijaron en formaldehído, fueron teñidos con Hoechst 33342 y observados al microscopio de epifluorescencia. La Fig. 7A muestra un óvulo de ratón, fertilizado, en el que se distinguen varios núcleos espermáticos, algunos de los cuales se observan hinchados.

### **2.- Observación al microscopio óptico de la presencia de los pronúcleos masculino y femenino.**

En algunas muestras, la co-incubación de los gametos (homólogo) se prolongó 8 o más horas, para permitir la formación de los pronúcleos (masculino y femenino) dentro del óvulo fertilizado. Las observaciones se realizaron con contraste de fases. La presencia de pronúcleos significó fertilización positiva. En la figura 7B, se muestra un óvulo del ratón, en el cual pueden observarse ambos pronúcleos.

### **3.- Observación de la primera división de segmentación.**

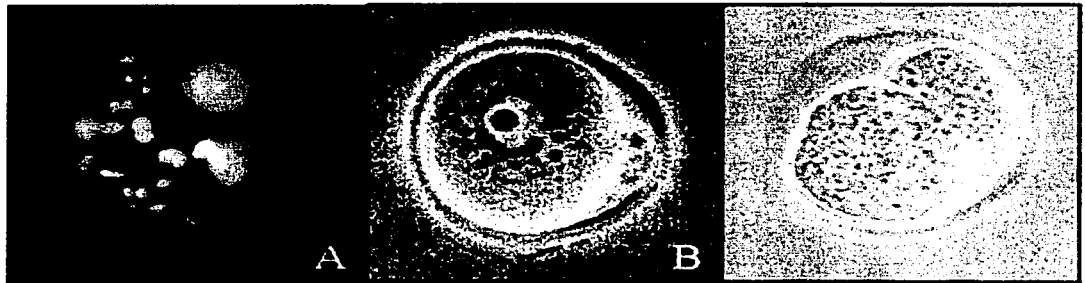


La primera división de segmentación, se tomó también como criterio de una fertilización positiva. Los óvulos fueron incubados con los espermatozoides durante 4 horas, se lavaron varias veces para quitar el exceso de los espermatozoides, se transfirieron al medio cleavage (medio adecuado para favorecer el desarrollo embrionario), se dejaron durante 18 horas en la incubadora a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire y se observaron al microscopio óptico. Un 60% de óvulos mostraron segmentación (divididos en dos blastómeras) (figura 7C). Estas muestras se dejaron en incubación por periodos de tiempo más prolongados, la mayoría de los embriones llegaron aproximadamente a 32 células y sólo algunos alcanzaron la etapa de blastocisto.

TINCIÓN CON H33342

PRESENCIA DE  
PRONUCLEOS

SEGMENTACION



**Figura 7. valoración de la fertilización en el sistema homólogo, óvulos de ratón-espermatozoides de ratón.** Los óvulos con o sin ZP fueron inseminados con espermatozoides capacitados. A) óvulo sin ZP inseminado por 4 horas y teñido con el reactivo de Hoechst 33342, para visualizar cabezas espermáticas hinchadas en el citoplasma del óvulo, por microscopia de epifluorescencia. B) óvulo con ZP fijado 8 horas post-inseminación y observado al microscopio de luz con óptica de contraste de fases. El óvulo presenta 2 pronúcleos en la parte central de su citoplasma. C) la inseminación se realizo por 18-24 horas. en el gameto se observan 2 blastómeras, resultado de la primera segmentación.

## **INHIBICIÓN DE LA FERTILIZACIÓN HOMÓLOGA Y HETERÓLOGA POR LA CRT.**

Luego de tener establecidas las condiciones experimentales para la evaluación de la fertilización, se probó el efecto de la CRT en el proceso. Los óvulos del hámster y los del ratón se pre-incubaron 1 hora con CRT y se inseminaron, por tiempos apropiados o preestablecidos (4 o 6 horas), con los espermatozoides del cobayo y del ratón, respectivamente.

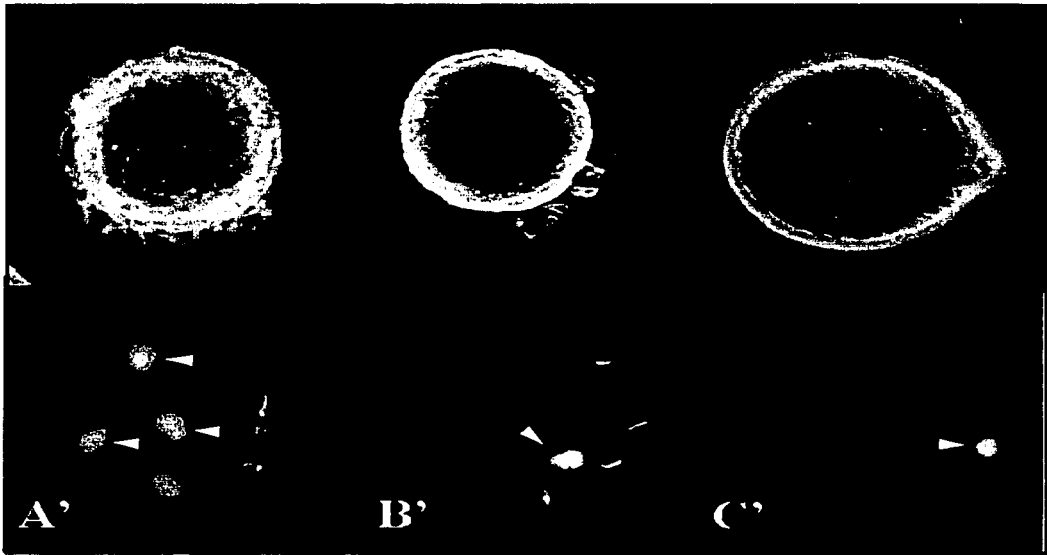
**Fertilización heteróloga.** En la muestra control, el porcentaje de óvulos fertilizados fue de 85-90 %. En esta muestra, sin la preincubación con la CRT, se observaron múltiples espermatozoides adheridos al óvulo y fue evidente que existe polipenetración, por el número de cabezas hinchadas que se observaron dentro de las células femeninas. (Fig. 8A). En contraste, en un 80 % de los óvulos del hámster tratados con CRT la fertilización fue inhibida, no se observaron espermatozoides dentro de los óvulos (Figs. 8 B' y C'), la fluorescencia intraovular que se visualizo corresponde al material nuclear del óvulo. Además, pocos espermatozoides estuvieron adheridos a los óvulos en su mayoría conservaron el acrosoma (Fig. 8 B). Adicionalmente, los óvulos tratados con la CRT, que si fueron fertilizados (15 %), se observaron monopenetrados y no polispermicos.

**Fertilización homóloga.** En la fertilización homóloga (ratón), 60 % de los óvulos control fueron fertilizados (Fig. 9). En los óvulos tratados con CRT, la fertilización sólo ocurrió en un 30 %; así la inhibición de la fertilización por CRT fue del 50 % en comparación con el control. La Fig. 9 B' muestra un óvulo pretratado con CRT e inseminado, en estos óvulos un número mayor de espermatozoides se observaron adheridos al óvulo, que en los óvulos de hámster

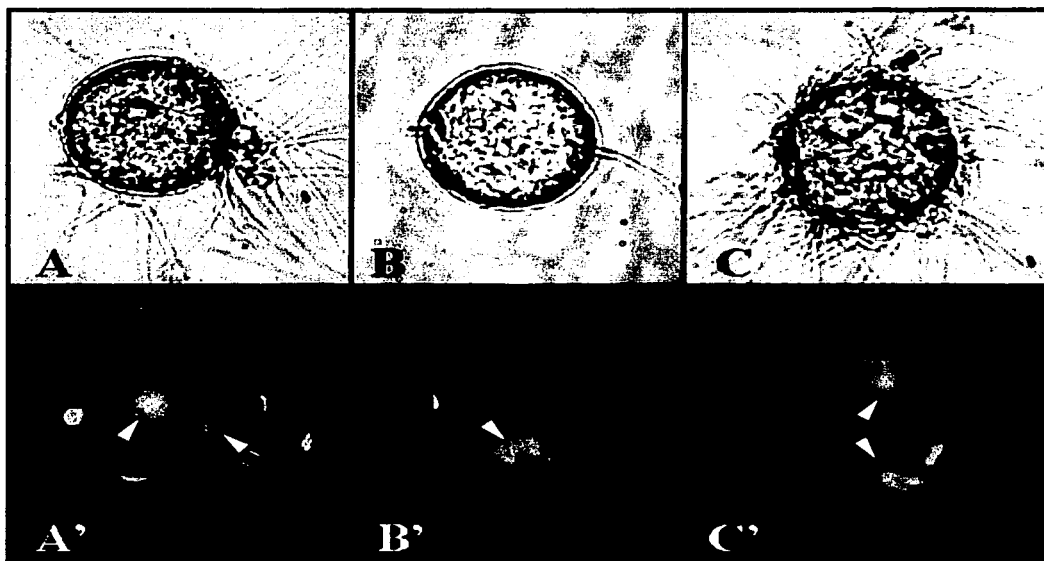
tratados con CRT (compare la Fig. 9 B vs 8 B).

Se incluyó como control adicional, el pretratamiento de los óvulos con calmodulina (CaM) antes de la inseminación. Estos óvulos presentaron en su citoplasma múltiples cabezas en proceso de des-condensación (Fig. 9). El número de espermatozoides adheridos al óvulo fue mayor que en la muestra control sin tratamiento (compare Figs. 9 A vs C).

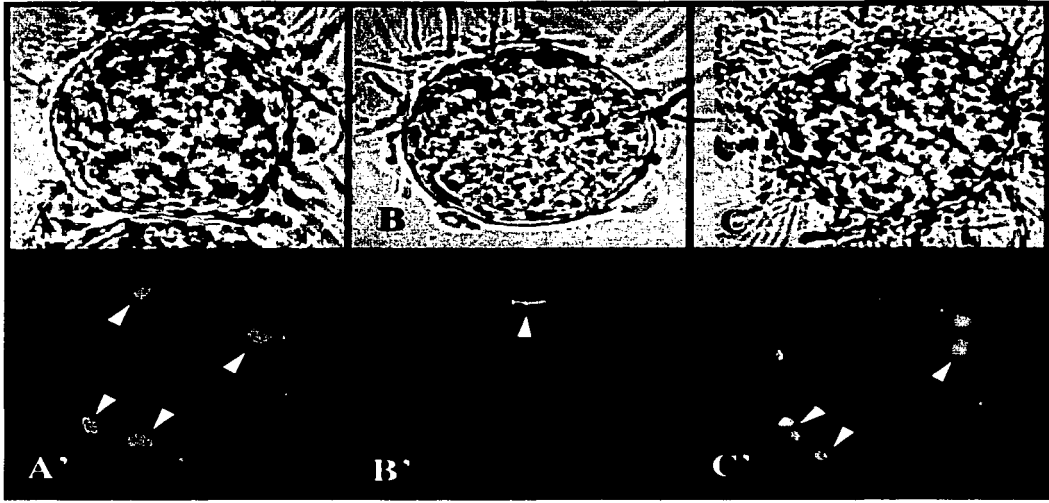
También en la fertilización heteróloga se incluyó el control de CaM. Los óvulos del hámster fueron preincubados con CaM 5 ng y luego inseminados con los espermatozoides del cobayo. El resultado mostró, que múltiples cabezas espermáticas en proceso de des-condensación estaban presentes en el interior del óvulo (Fig. 10 C') y el número de espermatozoides adheridos al óvulo (Fig. 10 C) fue mayor que en la muestra control (Fig. 10 A). Fue notable la cantidad excesiva de espermatozoides en contacto con los óvulos tratados con CaM (Fig. 10 C') en comparación con el control no tratado (Fig. 10 A'). Los resultados nos permiten sugerir que aparentemente la CaM favorece la interacción entre ambos gametos o favorece la interacción entre los espermatozoides. Además, que el efecto inhibitorio sobre la fertilización es específico de CRT, ya que no puede atribuirse ni a la proteína CaM, como proteína, ni al buffer de boratos, vehículo tanto de la CaM como de CRT.



**Figura 8. Inhibición de la fertilización heteróloga (óvulos de hámster y espermatozoides de cobayo) por la CRT.** Los óvulos del hámster fueron preincubados por una hora con la proteína CRT (5 ng), y posteriormente incubados con espermatozoides del cobayo, los cuales fueron capacitados y llevaron a cabo la RA. Los óvulos se fijaron a las 4 horas de interacción de los gametos, se tiñeron con Hoechst 33342 y se observaron al microscopio de epifluorescencia. A, B y C corresponden a los contrastes de fase de las micrografías de fluorescencia A', B' y C'. (A) Control, óvulo no preincubado con CRT. En el óvulo se observan varios espermatozoides adheridos. (A') Muestra varias cabezas de espermatozoides en el interior del óvulo y en proceso de des-condensación del DNA ( $\triangleright$ ). (B) y (C) Óvulos preincubados con CRT, donde se observa la presencia de uno o escasos espermatozoides adheridos. Nótese que muchos de ellos presentan acrosoma. (B') y (C') No se observan espermatozoides en el interior del óvulo. La marca fluorescente corresponde a un espermatozoide adherido en el exterior del óvulo ( $\triangleright$ ).



**Figura 9. Inhibición de la fertilización homóloga en ratón, por la CRT.** Los óvulos del ratón NMR-I fueron preincubados por una hora con la proteína CRT o con CaM (5 ng de cada una), y posteriormente incubados con espermatozoides del ratón, los cuales fueron previamente capacitados en el medio M16 y llevaron a cabo la RA. Los óvulos se fijaron a las 4 h de interacción con los espermatozoides, se tiñeron con Hoechst 33342 y se observaron al microscopio de epifluorescencia. A, B y C corresponden a los contrastes de fase de A', B' y C' micrografías de epifluorescencia. (A) Control de óvulos no preincubados con CRT. En el óvulo se observaron muchos espermatozoides adheridos ( $\triangleright$ ). (A') la micrografía muestra varias cabezas de espermatozoides en el interior del óvulo y en proceso de descondensación de su DNA. (B) los óvulos preincubados con CRT, donde se observa la presencia de varios espermatozoides adheridos. Nótese que muchos de ellos presentan acrosoma. (B') Óvulos preincubados con CRT, aparentemente no fertilizados ya que no se observan espermatozoides en el interior del óvulo. La marca fluorescente corresponde al material nuclear del óvulo ( $\triangleright$ ). (C) Óvulos preincubados con CaM, se observa la presencia de gran cantidad de espermatozoides adheridos y (C') Óvulos preincubados con CaM, donde se muestra que ocurrió fertilización, sugerida por la presencia de varios espermatozoides en el interior del óvulo ( $\triangleright$ ).



**Figura 10. Efecto de la CRT sobre la fertilización heteróloga.** Los óvulos de hámster fueron preincubados por una hora con la proteína CRT (5 ng) y como control la proteína CaM (5ng), y un control sin pretratamiento. Los óvulos fueron inseminados con espermatozoides de cobayo, los cuales fueron capacitados y llevaron a cabo la RA. Los óvulos se fijaron a las 4 h de interacción de los gametos, se tiñeron con Hoechst 33342 y se observaron al microscopio de epifluorescencia. A, B y C corresponden a los contrastes de fase de las micrografías de fluorescencia A', B' y C'. (A) Óvulo control, sin tratamiento, que presenta múltiples espermatozoides adheridos. (A') Óvulo control, el cual muestra en su citoplasma varias cabezas de espermatozoides en proceso de des-condensación del DNA ( $\blacktriangleright$ ). (B) Óvulo preincubado con CRT, donde se muestra la presencia de sólo un espermatozoide adherido. (B') El óvulo no se presenta espermatozoides en su citoplasma. La marca fluorescente corresponde a material nuclear femenino ( $\blacktriangle$ ). (C) Óvulo preincubado con CaM. Nótese el gran número de espermatozoides adheridos al óvulo. (C') Múltiples cabezas espermáticas se observan en el interior del óvulo, llevando a cabo el proceso de des-condensación ( $\blacktriangleright$ ).

## DISCUSION

En la fertilización, pocos segundos después de que las membranas plasmáticas de los gametos se fusionan entre sí se produce un aumento en la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmico en el óvulo. Éste se activa y se desencadenan una serie de procesos, de los cuales la RC es uno de los más tempranos y cuya función es la de evitar la polispermia (Gwatkin *et al*, 1973; Gulyas, 1980; Gulyas and Yuan, 1985; Yanagimachi R., 1988).

En la RC se produce la exocitosis de los GCs y con ello la liberación la liberación de todo su contenido, en el cual se han identificado entre otras proteínas, proteasas encargadas de modificar a la ZP (Yanagimachi, 1994; goldenberg y Ellison, 1980). Recientemente, Muñoz-Gotera y col. (2001), identificaron a otro nuevo componente de los gránulos corticales, a la calreticulina, del óvulo de hámster. La CRT también se excita durante la RC y aparentemente una vez excitada se relocaliza en el espacio perivitelino rodeando a la MP y al cuerpo polar (ver Fig. 11). En el espacio perivitelino, componentes excitados de los GCs forman una nueva estructura, la envoltura de los gránulos corticales (EGC) (Dandekar *et al*, 1992; Hoodbhoy *et al*, 1994, 1998, 2000, 2001), con una función sugerida en el bloqueo a la polispermia.

La CRT por su capacidad de unir  $\text{Ca}^{2+}$  es una proteína moduladora de la concentración del ión en el retículo endoplásmico. La CRT ha sido localizada en otros compartimientos celulares y diversas funciones han sido señaladas (Meldolesi *et al*, 1996; Ikawa *et al*, 1997; Shen y Buck, 1993; Nakamura *et al*, 1992, 1993). Dos consideraciones importantes sirvieron de base al presente estudio: 1) el conocimiento de la presencia de CRT en el interior de los gránulos de los linfocitos T citotóxicos (LTc) y el hecho de que al activarse el linfocito, la proteína es liberada al exterior de la célula (Dupuis *et al*, 1993; Andrin *et al*,



(1998), y 2) los componentes de los GCs son excitados durante la RC y para algunos de ellos se ha identificado su participación en el bloqueo a la polispermia. Por ejemplo: a) proteasas que actúan en la ruptura de ZP2 (Gwatkin *et al*, 1973; Moller y Wassarman, 1989, Ducibella *et al*, 1990, 1996; Hoobdhoy Talbot, 1994); b) glicosidasas cuya función es sobre los carbohidratos de la glicoproteína ZP3, cancelando su capacidad de unir espermatozoides e inducirles la RA (Cherr *et al*, 1988; Hoodbhoy y Talbot, 1993 a, b y 1994; Ducibella , 1988a) y c) otras proteínas de las cuales se conoce su peso molécula, pero no han sido identificadas molecularmente. Estas proteínas son: una proteína de 75 kDa (Pierce *et al*, 1990, 1992), proteínas de 56 y 62 kDa (Hoobdhoy *et al*, 2000) y una proteína de 32 kDa (Gross *et al*, 2000) las cuales al ser excitadas forman la EGC, esta malla se sugiere participa en el proceso de bloqueo a la polispermia. La CRT, la proteína de nuestro interés señalamos anteriormente que fue observada en la EGC, luego de la excitación de los GCs de los óvulos del hámster activados con el ionoforo A12384 (Muñoz-Gotera y col. 2001).

Por la localización que presenta la CRT excitada quisimos conocer, si esta proteína de los GCs tiene una función en el proceso del bloqueo a la polispermia. Para dar la respuesta a esta pregunta, era necesario contar con un sistema de fertilización. En nuestro laboratorio ya se manejaba un sistema heterólogo de fertilización, óvulos del hámster y espermatozoides del cobayo. Pero, consideramos conveniente contar con un sistema de fertilización homóloga, para semejar más las condiciones, in vivo, naturales. Decidimos trabajar con ratones.

Para el establecimiento del sistema de fertilización homóloga se manejaron dos cepas de ratones. Los parámetros evaluados fueron: 1) en las hembras el rendimiento, número de gametos ovulados en respuesta a la inducción de la superovulación. En este aspecto, la cepa Balb/c fue muy pobre; mientras que, la cepa NMR-1 presento un mayor número de óvulos en respuesta a la inducción. 2) para los espermatozoides, el criterio utilizado fue que presentaran

buena movilidad, que la conservaran y que sufrieran hiperactivación (movimiento característico de los espermatozoides capacitados) estas cualidades también fueron mejores en los espermatozoides de la cepa NMR-1 que en los de la Balb/c por otra parte, de los tres medios ensayados ( M16, MCM-PL y BWW) el medio M16 fue el que mejores resultados dio, para la movilidad, la capacitación y la respuesta de reacción acrosomal.

### **CRT en la fertilización**

La preincubación de los óvulos con 5 ng de CRT / ml de medio durante una hora a 37° C inhibió tanto la fertilización homóloga como la heteróloga. En la fertilización heteróloga control (óvulos del hámster-espermatozoides del cobayo), el porcentaje de óvulos fertilizados fue de 85-90%. El tratamiento de los óvulos con CRT inhibió la fertilización heteróloga en un 80 %. La fertilización homóloga fue menos eficiente, sólo un 60 % de los óvulos control fueron fertilizados. El pretratamiento con CRT de los óvulos del ratón sólo permitió la fertilización en un 30 % de los óvulos; así se registro una inhibición del 50 % atribuible al efecto de la CRT.

Los resultados en conjunto nos permiten sugerir que CRT, como otras proteínas de los GCs participe participan en el mecanismo de bloqueo a la polispermia, al ser excitada al espacio perivitelino. No contamos con datos que nos permitan definir el mecanismo por el cuál la CRT actúe. Dada la diversidad de funciones atribuidas a la CRT, podemos sugerir una variedad de posibilidades, por ejemplo: 1) como proteína moduladora del calcio, ella podría inhibir o activar enzimas con función en el procesos; 2) como chaperona, para mantener la conformación adecuada o el tránsito de proteínas a cierta región por ejemplo hacia la ZP; 3) se sugiere en la CRT un sitio de glicosidable, y ya sea que a través del carbohidrato que ella lleve unido o que dicho sitio de la CRT se una a un carbohidrato de la membrana plasmática del óvulo y con ello bloquee la región

para la unión o la fusión del espermatozoide al óvulo(ver comentario abajo); 4) se han descrito en la CRT regiones de reconocimiento y unión a otras proteínas. Estas regiones podrían ser los sitios de interacción de la CRT con las proteínas de los GCs y en conjunto formar la malla de los GCs, la cual funciona en el bloqueo a la polispermia.

Respecto a la posible interferencia de la CRT con la fusión de los gametos. Resultados preliminares en nuestro laboratorio (Muñoz-Gotera, comunicación personal) mostraron que la CRT exógena, añadida a los óvulos a tiempos cortos, hasta 10 minutos después de haber sido inseminados, la CRT es capaz de inhibir la fertilización como en los óvulos preincubados con CRT por una hora. Pero, que la CRT ya no inhibió cuando los óvulos habían sido coincubados con los espermatozoides por 20 minutos.

## CONCLUSIONES

1. Ambas cepas de ratón, la Balb/c y la NMR-I pueden ser capacitadas. Sin embargo seleccionamos a la cepa NMR-I por el porcentaje de espermatozoides que habían sufrido la RA después de 2 horas y 45 minutos.
2. Los tres medios ensayados el M16, el MCM-PL y el BWW permitieron la capacitación de los espermatozoides de las dos cepas de ratón. El mejor medio capacitante para el espermatozoide del ratón fue el M16, por que ambas cepas se capacitaron en él en el mismo tiempo de incubación.
3. Consideramos 1 hora 20 minutos, el tiempo de capacitación apropiado, valorado por el movimiento hiperactivado de los espermatozoides y el porcentaje de gametos con RA, determinada por el método de azul de Coomassie.
4. La calreticulina participa en el bloqueo a la polispermia tanto en el sistema homólogo del ratón como en el heterólogo hámster-cobayo.
5. Sugerimos que el mecanismo de acción de la calreticulina para bloquear la polispermia, ocurra por la unión de CRT con el sitio de fusión del óvulo con el espermatozoide, obstruyendo el receptor para el espermatozoide.

## REFERENCIAS

Aguas y Pinto Da Silva, 1989. Bimodal redistribution of surface transmembrane glycoproteins during  $Ca^{2+}$  dependent secretion (acrosome reaction) in boar spermatozoa. *J. Cell Sci.* Jul;93 (Pt 3):467-479.

Andrin, C., Pinkoski, M., Burns, K., Atkinson, E., Krahenbuhl, O., Hudig, D., Fraser, S., Winkler, U., Tschopp, J., Opas, M., Bleackley, R., and Michalak, M. 1998. Interaction between a  $Ca^{2+}$ -binding protein calreticulin and perforin, a component of the cytotoxic T-cell granules. *Biochemistry.* Jul 21;37(29):10386-94.

Barros C and Austin CR. 1967. In vitro fertilization and the sperm acrosome reaction in the hamster. *J. Exp. Zool.* Dec;166 (3):317-323.

Bedford JM. 1970. Sperm capacitation and fertilization in mammals. *Biol. Reprod (Suppl)* 2:128-158.

Braden, A.W., Austin, C.R. David H.A. 1954. The reaction of the zona pellucida to sperm penetration. *J. Exp Zool.*, 180: 251-266.

Camacho, P. and Lechleiter, J. 1995. Calreticulin inhibits repetitive intracellular  $Ca^{2+}$  waves. *Cell.* 82, 765-771.

Collins, J. Alderton, B, Treves, S and Volpe, P. 1989. Sequence homology of a canine brain calcium-binding protein with calregulin and the human Ro/SS-A antigen. *Biochem. Biophys Res Commun.* 164: 575-579.

Coppolino, M.; Woodside, M.; Demaurex, N. 1997. Calreticulin is essential for integrin-mediated calcium signalling and cell adhesion. *Nature* . Apr. 24, 386: 66 27, 843-7.

Cowan AE, Myles DG, Koppel DE. 1987. lateral diffusion of the PH-20 protein on guinea pig sperm: evidence that barriers to diffusion maintain plasma membrane domains in mammalian sperm. *J. Cell Biol. Apr*; 104(4): 917-923.

Cran, D. G., Moor, R. M., and Irvine, R. F. 1988. Initiation of the cortical reaction in hamster and sheep oocytes in response to inositol triphosphate. *J. Cell. Sci.* 91: 139-144.

Cran, D.G. and Esper, C.R. 1990. Cortical granules and the cortical reaction in mammals. *J. Reprod Fertil Suppl.*, 42: 177-188.

Cherr, N., Drobnis, E., and Katz, D. 1988. Localization of cortical granule constituents before and after exocytosis in the hamster egg. *J. Exp. Zool*, 246: 81-93.

Damiani, E., Spamer, C., Heilmann, C. Salvatori, S. and Margreth, A. 1988. Endoplasmic reticulum of rat liver contains two closely related to skeletal muscle SR Ca-ATPase and calsequestrin. *J Biol. Chem.* 263:340-343.

Dandekar P, Aggeler J, Talbot P. 1992. Structure and composition of the extracellular matrix of human oocyte and cumulus masses. *Hum Reprod* 7:391-398.

Dandekar P, Talbot P. 1992. Perivitelline space of mammalian oocytes: extracellular matrix of unfertilized oocyte and formation of a granule envelope following fertilization. *Mol Reprod Dev* 31:135-143.

Ducibella, T. 1996. The cortical reaction and development of activation competence in mammalian oocytes. *Human Reproduction*. Vol 2. No. 1. 29-42.

Ducibella, T., Duffy, P., and Buetow, J. 1994. Quantification and localization of cortical granules during oogenesis in the mouse. *Biol. Of Reprod.* , 50: 467-473.

Ducibella, T., Rangarajan, S. And Anderson, E. 1988 b. The development of mouse oocyte cortical reaction competence is accompanied by mayor change in cortical vesicles and not cortical granule depth. *Develop. Biol.*, 130: 789-792.

Ducibella, T; Anderson, E; Albertini, D; Alberg, J and Ragarajan, S. 1988 a. Cuantitative studies of changes in cortical granules number and distribution in the mouse during meiotic maturation. *Dev. Biol.* 130: 184-197.

Ducibella, T; Kurasawa, S; Rangarajan, S; Kopf, G and Schultz, R. 1990. Precocious loss of cortical granules during mouse oocytes meiotic maduration and correlation with an egg-induced modification of the zona pellucida. *Dev. Biol.* 137: 46-55.

Dupuis, M.; Schaerer, E.; Krause, K and Tschopp, J. 1993. The calcium-binding protein calreticulin is a major constituent of lytic granules in cytolytic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 177, 1-7.

Eddy E. 1988. The spermatozoon. En the physiology of reproduction. Eds. E. Knobil & J. Neil. Edt. Raven Press Lid. New York. pp: 27-67.

Eggleton, P, Licu, T et al. 1994. Calreticulin is related from activeted neutrophils and binds to C1q and mannan-binding protein. *Clin. Inmunol. Inmunopathol.* 72:3 405-409.

Evans SC, Youakim A, Shur BD. 1995. Biological consequences of targeting  $\beta$ 1,4-galactosyltransferase to two different subcellular compartments. *Bioessays* 17:261-268.

Fawcett DW. 1975. The mammalian spermatozoon. *Dev. Biol.* Jun; 44(2):394-436

Florman HM, Wassarman PM. 1985. O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity. *Cell* 41:313-324.

Goldenberg, M. and Elinson, R. (1980). Animal/Vegetal Differences in Cortical Granule Exocytosis During Activation of the Frog Egg. *Develop., Growth and Differ.*, 22 (3), 345-356.

Goldenberg, M. and Elinson, R. 1980. Animal/Vegetal Differences in Cortical Granule Exocytosis During Activation of the Frog Egg. *Develop., Growth and Differ.*, 22 (3), 345-356.

Greve JM, Wassarman PM. 1985. Mouse egg extracellular coat is a mixture of interconnected filaments possessing a structural repeat. *J. Mol. Biol.*; 181: 253-264.

Gross V.S., Wessel G., Florman H.M and Ducidella T. 2000. A monoclonal antibody that recognizes mammalian cortical granules and a 32-kilodalton protein in mouse eggs. *Biol Reprod.* Aug;63(2):575-81.

Gulyas, B. J. 1980. Cortical granules of mammalian eggs. *Int. Rev. cytol.* 63: 357-392.



Gwatkin, R.B., Williams, D.T., Hartmann, J.F. and Kniazuk, M. 1973. The zona reaction of hamster and mouse eggs: production *in vitro* by a trypsin-like protease from cortical granules. J. Reprod. Fert., 32: 259-265.

Hernández, E. O.; Roa-Espitia, A.; Trejo, J. and Mújica, A. 1996. Sperm protein (sp50) binds to acrosome and plasma membrane in a  $Ca^{2+}$ -dependent manner: Possible role in acrosome reaction. Mol. Reprod. And Develop., 43: 366-375.

Hernández R, Fernández C y Baptista P. 2001. Metodología de la investigación. Mc Graw Hill. 501p.

Hoodbhoy T, Carroll Jr E, Talbot P. 2000. Relationship between p62 and p56, two proteins of the mammalian cortical granule envelope, and hyalin, the mayor component of the echinoderm hyaline layer, in hamsters. Biol Reprod 62:979-987.

Hoodbhoy T, Talbot P. 2001. Characterization, fate and function of hamster cortical granule components. Mol Reprod Develop 58: 223-235.

Hoodbhoy, T. And Talbot, P. 1993 a .The Use of Confocal Scanning Laser Microscopy (CSLM) to study the fate of the cortical granules (GC) components following fertilization in the hamster. Biol. Reprod., suppl. 48: 166.

Hoodbhoy, T. And Talbot, P. 1993 b. The Use of Confocal Scanning Laser Microscopy (CSLM) to study the fate of the cortical granules following their release from hamster oocytes. Monday Fertilization I. 819-824.

Hoodbhoy, T. And Talbot, P. 1994. Mammalian cortical granules: contents, fate and function. *Mol. Reprod. And Develop.*, 39: 439-448.

Hoodbhoy, T.; Dandekar, P.; Calarco, P. and Talbot, P. 2001. p62/p56 are cortical granule proteins that contribute to formation of the cortical granule envelope and play a role in mammalian preimplantation development. *Mol. Reprod And Dev.* 59: 78-89.

Hope, J. 1965. The fine structure of the developing follicle of the Rhesus ovary. *J. Ultras. Res.*, 12:592-610.

Ikawa, M.; Wada, I.; Kominami, K. et al., 1997. The putative chaperone calmeglin is required for sperm fertility. *Nature*. Jun 5, 387:6633, 607-11.

Khanna, N., Tokuda, M., and Waisman, D. 1986. Conformational changes induced by binding of divalent cations to calregulin. *J Biol Chem*. 1986 Jul 5;261(19):8883-7.

Khanna, N., Tokuda, M., and Waisman, D. 1987. Comparison of calregulins from vertebrate livers. *Biochem J.* 242 (1):245-51.

Kishore, U., Sontheimer, R., Sastry, K., Zaner, K., Zappi, E., Huges, G., Khamashta, M., Strong P., reid, K., and Eggleton, P. 1997. Release of calreticulin from neutrophils may alter C1q mediated immune functions. *Biochem J.* Mar 1;322 ( Pt 2):543-50.

Laidlaw, M. And Wessel, G. 1994. Cortical granule biogenesis is active throughout oogenesis in sea urchins. *Development*, 120: 1325-1333.

Larson, J and Miller, D. 1999. Simple histochemical stain for acrosomes on sperm from several species. *Molecular Reproduction and Development*. USA Illinois. 52: 445-449.

Lebeche, D. and Kaminer, B. 1992. Characterization of a calsequestrin-like protein from sea urchin eggs. *Biochem J*. Nov 1;287 ( Pt 3):741-7.

Lewis, M., Mazzarella, R. And Green, M. 1985. Structure and assembly of the endoplasmic reticulum. The synthesis of three major endoplasmic reticulum proteins during lipopolysaccharide-induced differentiation of murine lymphocytes. *J Biol Chem*.Mar10;260(5):3050-7.

Lievremont, J.; Hill, A.; Tran, D.; Coquil, J.; Stelly, N. and Mauger, J. 1996. Intracellular calcium store and inositol 1,4,5-triphosphate receptor in rat liver cells. *Biochem J*. 314, 189-197.

Macek MB, Lopez LC, Shur BD. 1991. Aggregation of  $\beta$ 1.4-galactosyltransferase on mouse sperm induces the acrosome reaction. *Dev.Biol*. 147-444.

Macer, D and Koch, G. 1988. Identification of a set of calcium-binding proteins in endoplasmic reticulum, the luminal content of the endoplasmic reticulum. *J.Cell. Sci*. 91: 61-70.

Margalioth EJ, Navot D, Laufer N, Lewin A, Rabinowitz R . 1986. Correlation beetwen the zona-free hamster egg sperm penetration assay and human *in vitro* fertilization. *Fertile Steril*. May;45(5):665-670.

McCauliffe, D., Lux, F., Lieu,T et al. 1990. Molecular cloning, expression and chromosome 19 localization of human Ro autoantigen. *J. Clin. Invest*. 85: 1379-1391.

McLennan, D., Yip, C., Iles, G. and Seeman, P. 1972. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 37, 469-477.

Meldolesi, J.; Krause, K. And Michaak, M. 1996. Calreticulin: how many functions in how many cellular compartments? Calcium Cell. 20 (1), 83-86..

Michalak, M., Campbell, K., and McLennan, D. 1980. Localization of the high affinity calcium binding protein and an intrinsic glycoprotein in sarcoplasmic reticulum membranes. J. Bio Chem. Feb 25; 255 (4): 1317-26.

Michalak, M.; Milner, R.; Burns, K. And Opas, M. 1992. Calreticulin. J. Biochem. 285, 681-692.

Michalak, M.; Corbett, E.; MESAELI, N.; Nakamura, K. and Opas, M. 1999. Calreticulin: one protein, one gene, many functions. Biochem J. 1999 Dec 1;344 Pt 2:281-92.

Milner, R.; Baksh, S.; Shemanko, C.; Carpenter, M.; Smillie, L.; Vance, J.; Opas, M. and Michalak, M. 1991. Calreticulin, and not calsequestrin, is the major calcium binding protein of smooth muscle sarcoplasmic reticulum and liver endoplasmic reticulum. J Biol Chem. 266(11):7155-65.

Miller D.J, Gong X., Decker G. and Shur B.D. 1993. Egg cortical granule N-acetylglucosaminidase is required for the mouse zona block to polyspermy. J Cell Biol. Dec; 123:1431-40.

Miyazaki S and Igusa Y. 1981. Fertilization potential in golden hamster eggs consists of recurring hyperpolarizations. Nature. Apr 290:702-4.

Moller C, Bleil JD, Kinloch RA, Wassarman PM. 1990. Structural and functional relationships between mouse and hamster zona pellucida glycoproteins. *Dev. Biol.* 137:276-286.

Moller and Wassarman. 1989. Characterization of a proteinase that cleaves zona pellucida glycoprotein ZP2 following activation of mouse eggs. *Dev. Biol.*, 32:103-112.

Muñoz-Gotera R, Enrique O. Hernández-Gonzales, Guillermo Mendoza Hernández, Ruben G. Contreras and Adela Mújica. 2001. Exocytosis of a 60 kDa protein (Calreticulin) from activated hamster oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 9999:1-9.

Muñoz-Gotera, R. 1998. Detección y localización de la proteína Sp50 en los óvulos del hámster antes y después de la reacción cortical. Tesis de grado M en C. CINVESTAV.IPN.

Nagae T, Yanagimachi R, Srivastava PN, Yanagimachi H. 1986. Acrosome reaction in human spermatozoa. *Fertil Steril.* May;45(5):701-707.

Nakamura M. and Moriya M. 1993. An endoplasmic reticulum protein, calreticulin, is transported into the acrosome of rat sperm. *Exp. Cell. Res. Mar.* 205: 1, 101-10.

Nakamura M., Oshio S., Tamura A., Okinaga S. And Arai K. 1992. Antisera to calreticulin inhibits sperm motility in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* Jul 31, 186:2, 984-90.

Nash P., Opas M. And Michalak M. 1994. Calreticulin: not just another calcium-binding protein. *Mol. and Cell. Biochem.* 135: 71-78.

Nixon V., McDongall A. and Jones K. 2000. Ca<sup>2+</sup> oscillations and the cell cycle at fertilization of mammalian and ascidian eggs. *Biol of the cell* 92, 187-196.

Ohsako S., Hayashi Y. and Bunick D. 1994. Molecular cloning and sequencing of calnexin-t. An abundant male germ cell-specific calcium-binding protein of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* May 13;269(19):14140-8.

Okada A., Yanagimachi R., and Yanagimachi H. 1986. Development of a cortical granule-free area of cortex and the perivitelline space in the hamster oocyte during maturation and following ovulation. *J. Submicrosc. Cytol.* 18: 233-247.

Ostwald T. and Mac Lennan, D. 1974. Isolation of a high affinity calcium binding protein from sarcoplasmic reticulum. *J. Biol.Chem.* 249: 974-979.

Parys, J.; Mc Pherson, S. And Mathews, L. (1994). Presence of Inositol 1,4,5-Triphosphate Receptor, Calreticulin, and Calsequestrin in Eggs of Sea Urchins and *Xenopus leavis*. *Developmental Biology.* 161, 466-476.

Peterson RN, Bundunman D, Freund M. 1978. Use of a fluorescent dye to measure drug-induced changes in the membrane potential of boar spermatozoa. *Life Sci.* Feb;22(8):659-666

Pierce, K; Siebert, M; Kopf, G; Schultz, R and Calarco, P. 1990. Characterization and localization of a mouse egg cortical granule antigen prior to and following fertilization or egg activation. *Dev. Biol.*, 141: 381-392.

Pierce, K., Grunvald, E., Schultz, R. And Kopf, G. 1992. Temporal pattern of synthesis of the mouse cortical granule protein, p75, during oocyte growth and maturation. *Develop. Biol.*, 152: 145-151.

Primakoff P, Hyatt H, Tredick-Kline J. 1987. Identification of sperm and purification of a sperm surface protein with a potential role in sperm-egg membrane fusion. *J. Cell Biol.* Jan;104(1):141-149.

Shen S. and Buck W. 1993. Sources of calcium in sea urchin eggs during the fertilization response. *Dev Biol.* May;157(1):157-69.

Shur BD. and Neely CA. 1988. Plasma membrane association, purification, and characterization of mouse sperm  $\beta$ 1,4-galactosyltransferase. *J. Biol. Chem.* 263: 17706-17714.

Simerly C. and Schatten G. 1993. Techniques for localization of specific molecules in oocytes and embryos. In : *Methods In Enzymology*, vol 225, 516-553.

Stewart-Savage J. and Bavister, B. (1988). A cell surface block to polyspermy occurs in golden hamster eggs. *Dev Biol.* 128(1):150-7. Shapiro, H.A. (1936). Breeding Habits of Amphibia. *Brit. Jour. Exp. Biol.* 13:48.

Suarez HG, Nardeux PC, and Barbich M. 1985. Dna-mediated transfer of actinomycin D resistance into cultured mouse cells. *Exp. Cell Res.* Feb;156(2):553-557.

- Suarez, S., Katz, D., Owen, D., Andrew, J. and Powel, R. (1991). Evidence for the Function of Hipersectividad Motility in Sperm. *Biol. Reprod.* 44: 375-381.
- Szollosi D. 1967. Development of cortical granules and the cortical reaction in rat and hamster egg. *Anat. Rec.* 159, 431-446.
- Trejo R and Mújica A. 1990. Changes in calmodulin compartmentalization throughout capacitation and acrosome reaction in guinea pig spermatozoa. *Mol. Dev.* Aug;26(4):366-376.
- Treves, S., DeMattei, M., Lanfred, M., Villa, A., Green, N. Maclellan, D., Meldolesi, J. And Pozzan, T. 1990. *Biochem. J.* 271, 473-480.
- Van den Berg CW, Aerts Pc, Van Dijk H. 1990. Functional assay of C5-activating and non activating cobra venom factor preparations in the mouse sytem. *J. Inmmunol. Methods.* Oct 19;133(2):199-206.
- Van P. Peter, F. And Soling H. 1989. Four intracisternal calcium-binding glycoproteins from rat liver microsomes with high affinity for calcium. No indication for calsequestrin-like proteins in inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive calcium sequestering rat liver vesicles. *J Biol Chem.* 264(29):17494-501.
- Villarroya S. And Scholler R. 1987. Lateral diffusion of a human sperm-head antigen during incubation in a capacitation medium and induction of the acrosome reaction "in vitro". *J. Reprod. Fert.* 80: 545-562.
- Waisman D. Salimath B. And Anderson M. 1985. Isolation and characterization of CAB-63, a Novel calcium-binding protein. *J. Biol. Chem.* 260, 1652-1985.



Wassarman P. 1988. The Mammalian ovum. In: Physiology of Reproduction (E. Koobil & J. Neill et al). Raven Press. Ltd. New York. 69-102.

Wassarman P. 1990. Profile of a mammalian sperm receptor. Development. 108:1-17.

Wassarman P. 1987. The biology and chemistry of fertilization. Science. 235:553-560.

Watanabe D., Yamada K., Nishina Y., Koshimizu U., Nagata A. and Nishimune Y. 1994. Molecular cloning of a novel Ca(2+)-binding protein (calmegin) specifically expressed during male meiotic germ cell development. J Biol Chem. Mar 11;269(10):7744-9.

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

Yanagimachi R. and Chang M.C. 1961. Fertilizable Life of golden hamster ovary and their morfological changes at the time of losing fertilizability. J. Exp. Zool., 148: 185-197.

Yanagimachi R. 1994. Mammalian fertilization. In: Knobil E et al. The Physiology of Reproduction. New York: Raven Press, 119-316.

Yudin A, Gottlieb W, Meizel S. 1988. Effects of cations and other medium components on the zona-induced acrosome reaction of hamster spermatozoa. Dev. Growth Differ 30:651-659.

Zhu Q., Zelinka P., White T., and Tanzer M. 1997. Calreticulin-integrin bidirectional signaling complex. *Biochem Biophys Res Commun.* Mar 17;232(2):354-8.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

## **APENDICE**

### **1. Medio Modificado de Tyrode (MMT).**

NaCl 116.73 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.8 mM, NaHCO<sub>3</sub> 11.9 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O 0.36 mM, MgCl<sub>2</sub> 0.49 mM, Piruvato 0.25 mM, Ac. láctico 2.0 mM, Glucosa 5.56 mM, KCl 2.8 mM.

### **2. Medio M2**

**Stock A 10X.** NaCl 5.534 g, KCl 0.356 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.162 g, MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O 0.293, lactato de sodio 4.349 ml de una solución al 60%, glucosa 1.00 g, penicilina 0.060 g, estreptomicina 0.050 g, se aforaron a 100 ml con agua destilada.

**Stock B 10X.** NaHCO<sub>3</sub> 2.101g y rojo de fenol 1mg se aforaron a 100 ml con agua destilada.

**Stock C 100X.** piruvato de sodio 0.036g se aforaron a 10 ml con agua destilada

**Stock D 100X.** CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0.252g se aforaron a 10 ml con agua destilada

**Stock E 10X.** HEPES 5.958g se aforaron a 100 ml con agua destilada.

### **Modo de preparación**

Para preparar 50 ml del medio M2, se tomaron 5ml de los stocks A y B y 0.5 ml de los stocks C, D y E; a la mezcla se le adicionó 200 mg de BSA libre de ácidos grasos y se ajustó el pH a 7.6.

### 3. Medio M16

El medio M16 se preparó como sigue:

**Stock A 10X.** NaCl 5.534 g, KCl 0.356 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.162 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.293, lactato de sodio 4.349 ml de una solución al 60%, glucosa 1.00 g, penicilina 0.060 g, estreptomycin 0.050 g se aforaron a 100 ml con agua destilada.

**Stock B 10X.**  $\text{NaHCO}_3$  2.101 g y rojo de fenol 1 mg se aforaron a 100 ml con agua destilada.

**Stock C 100X.** piruvato de sodio 0.036 g se aforaron a 10 ml con agua destilada.

**Stock D 100X.**  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.252 g se aforaron a 10 ml con agua destilada.

Para preparar 50 ml del medio M16, se tomaron 5ml de los stocks A y B y 0.5 ml de los stocks C y D. A éstos se les adiciono 200 mg de BSA libre de ácidos grasos y la mezcla se colocó 30 minutos en la incubadora con 5%  $\text{CO}_2$  y 95% de aire, para pregasearlo. Las soluciones stock y el medio M16 se filtraron a través de un filtro Millipore de 0.22  $\mu$ , el M16 se fraccionó en alícuotas de 10 ml. Todo el proceso se realizó en una campana de flujo laminar vertical

### 4. Medio MCM-PL

NaCl 105.08 mM,  $\text{NaHCO}_3$  25.07 mM,  $\text{CaCl}_2$  1.71 mM, piruvato de sodio 0.25 mM y lactato de sodio 20.0 mM, pH 7.4, complementado con 0.3% de albúmina sérica bovina.