



01674

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MÉXICO**

**MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCION Y DE LA SALUD ANIMAL**

**¿DEPENDE LA DESCONDENSACIÓN DEL NÚCLEO ESPERMÁTICO
DEL COBAYO DE LA ESTABILIDAD DE LA SUBESTRUCTURA
DE LA TECA PERINUCLEAR?**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

JORGE HERNÁNDEZ ESPINOSA

TUTOR: ADELA MÚJICA DE HERNÁNDEZ

COMITÉ TUTORAL: MARÍA DE LOURDES JUÁREZ MOSQUEDA
HOMERO HERNÁNDEZ MONTES

MÉXICO, D.F.

2004



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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

DEDICATORIAS

A mi padre por nunca apartarse de mi (Q.E.P.D.)

A mi madre que admiro por su fuerza y su cariño

Al tesoro de mi vida: Angie

A mis pequeños angelitos: Diana Itzel y Esteban

A mi hermano: Carlos

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: JORGE HERNANDEZ

ESPINOSA

FECHA: 29 MARZO 04

FIRMA: 

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Adela Mújica de Hernández, a su finísima persona y por todo su apoyo y tiempo dedicados.

A la Dra. Ma. de Lourdes Juárez Mosqueda, por su amistad, asesoría y confianza para la realización de este trabajo. Mil Gracias.

Al Dr. Homero Hernández Montes, por su amistad y su valiosa asesoría, siempre en pro de mejorar el presente trabajo.

A la Biol. María de Lourdes Rojas Morales y a la QFB. Sirenia González Pozos de la Unidad de Microscopía Electrónica del CINVESTAV, IPN.

A la QFB. María de la Luz Rosales Montaña de la Unidad de Microscopía Electrónica de la FMVZ, UNAM.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, por las facilidades brindadas para la realización de mi posgrado.

Al Dr. Mario Pérez Martínez, Jefe del Departamento de Morfología de la FMVZ UNAM por el apoyo que me brindó para la realización de mis estudios de posgrado.

INDICE

	Paginas
INTRODUCCION	1-9
OBJETIVOS	10
HIPOTESIS	11
MATERIAL Y METODOS	12-16
RESULTADOS	17-22
DISCUSION	23-27
REFERENCIAS	28-36

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1	37
Figura 2	38
Figura 3	39
Figura 4	40
Figura 5	41
Figura 6	42
Figura 7	43
Figura 8	44
Figura 9	45
Figura 10	46
Figura 11	47
Figura 12	48
Figura 13	49

RESUMEN

La teca perinuclear (TP) es una estructura citoesquelética que cubre al núcleo de los espermatozoides de los mamíferos, está conformada por la capa subacrosomal y la capa posacrosomal. La TP de los espermatozoides maduros del cobayo presenta una subestructura (ST) localizada a manera de cinturón en la porción apical de la capa posacrosomal. La subestructura la pierden los espermatozoides al experimentar conjuntamente la capacitación y la reacción acrosomal (RA). Durante la fertilización, poco después de la fusión de la membrana plasmática del espermatozoide con la del huevo, la cabeza del espermatozoide sufre la pérdida de la TP y la descondensación de la cromatina para la formación del pronúcleo masculino. Los objetivos de esta investigación fueron: definir en espermatozoides de cobayo con TP expuesta por el tratamiento con Brij-36-T y resuspendidos en NaCl o en MCM, si la descondensación del núcleo espermático depende de la integridad de la teca perinuclear. Para ello se valoró la descondensación *in vitro* del núcleo espermático de espermatozoides en diferentes estados que difieren en la integridad de su TP como es el caso de la reacción acrosomal. Para la descondensación se ensayó la combinación *in vitro* de un agente reductor de enlaces disulfuro, el ditiotreitol (DTT) (1.5 mM) y de un agente que compite con el ADN por las protaminas, la heparina (5 USP). Las muestras ensayadas fueron espermatozoides maduros no capacitados con TP intacta y con la ST presente, estos mismos espermatozoides fueron tratados con faloidina, para estabilizar el citoesqueleto de actina de la TP, que estabiliza a la ST y espermatozoides con RA. Los parámetros valorados fueron: la pérdida de la ST y el hinchamiento de las cabezas. Las observaciones se realizaron al microscopio electrónico de transmisión y al microscopio fotónico. Los espermatozoides maduros resuspendidos en NaCl o en MCM y con reacción acrosomal inducida sincrónicamente con A23187 fueron más sensibles a la descondensación inducida por el tratamiento combinado de DTT y de heparina (valorada a los 15 s, 30 s, 45 s, 1, 2 y 3 min), en comparación con los espermatozoides maduros no capacitados. El tratamiento en forma individual, con uno u otro de los agentes utilizados no tuvo efecto aparente sobre la TP. Los espermatozoides maduros con teca expuesta y estabilizados con faloidina no presentaron descondensación del núcleo espermático observado a los 3 min del tratamiento con ambos agentes, ni perdieron la subestructura de la TP, esto en comparación con los espermatozoides no tratados con faloidina. Un cambio singular en los espermatozoides tratados con faloidina fue la producción de espacios alternados electrolúcidos y electrodensos en la base de la ST. Los resultados sugirieron, 1) que la presencia de la ST retrasa la descondensación nuclear, 2) La ausencia de la ST permite una ligera descondensación tempranamente, en relación con los espermatozoides que la conservan y 3) que la alteración de la integridad de la TP, resultado de la RA, que incluye la ausencia de la ST, es indispensable para una adecuada descondensación nuclear.

Palabras clave: Espermatozoide, teca perinuclear, descondensación, DTT, heparina y faloidina.

ABSTRACT

The perinuclear theca (PT) is the cytoskeletal coat of mammalian sperm nucleus, and it is conformed by the subacrosomal and postacrosomal layers. The PT of the mature guinea pig spermatozoa presents a substructure (ST) located as a belt in the apical portion of the postacrosomal layer. The ST is absent in capacitated acrosome reacted spermatozoa. During fertilization, soon after fusion of the sperm and egg plasma membranes, the sperm head suffers the loss of the PT and decondensation of the chromatin for the formation of the male pronucleus. The objective of this research was to define: if sperm nuclei decondensation depends on the integrity of the PT. For that, it was evaluated if in vitro decondensation of the sperm nucleus vary under different sperm physiological states, that differ in the integrity of their PT, as is the case of the acrosome reacted spermatozoa. For nuclei decondensation, combination of two reagents was used: dithiothreitol (DTT), for disulfide rupture between DNA-associated protamines and heparin which has been suggested to compete with DNA for protamines. The assayed samples were: 1) mature non-capacitated spermatozoa with intact PT and ST, 2) the same sample type as (1) but phalloidin treated, for the PT actin cytoskeleton stabilization, that further results in the ST stabilization. Two parameters were evaluated, the loss of the ST, by electron microscopy, and the swelling of the heads by photonic microscopy. DTT- heparin treatment produced stronger nuclei decondensation in spermatozoa with synchronous acrosome reaction, induced by A23187, than in mature non-capacitated spermatozoa (evaluations were performed from heparine 15 sec up to 3 min). When heparine or DTT were separately assayed, no nuclei decondensation was observed. In mature non-capacitated spermatozoa treated with phalloidin, DTT-heparine treatment did not produce nuclei decondensation, additionally the ST was retained and furthermore alternate electron dense/electron light small zones were observed at the base of the ST. Results presented suggested: 1) that whole PT with intact ST retards nuclear decondensation, 2) while, whole PT in which the ST is absent allows a slight nuclear decondensation and 3) that the PT integrity alteration, as a result of the acrosomal reaction, that also includes the absence of the ST, is indispensable for an appropriated nuclear decondensation.

Key words: spermatozoa, perinuclear theca, nuclear decondensation, DTT, heparine and phalloidin.

INTRODUCCION

El espermatozoide de los mamíferos es una célula compuesta por dos partes principales: la cabeza y el flagelo. La cabeza se encuentra constituida de afuera hacia adentro, por las siguientes estructuras: la membrana plasmática, el acrosoma, la teca perinuclear (TP), la envoltura nuclear y la cromatina (Courtens y col., 1976). El flagelo está constituido por la pieza media que contiene a las mitocondrias, por la pieza principal y la pieza terminal (Fawcett, 1975; Courtens y col., 1976).

La teca perinuclear es una estructura citoesquelética que cubre al núcleo de los espermatozoides de los mamíferos, excepto en la región de inserción del flagelo (Courtens y col., 1976; Lalli y Clermont, 1981; Oko y Clermont, 1988, 1991; Oko y Maravei, 1994). La teca se encuentra formada por la capa subacrosomal o perforatorio, que se ubica entre la membrana acrosomal interna y la envoltura nuclear, y la capa posacrosomal o cáliz, la cual rodea caudalmente al núcleo y está recubierta por la membrana plasmática (Oko y Clermont, 1991; Fouquet y Kann, 1994, Oko y Morales, 1994). La teca perinuclear es aparente al microscopio electrónico desde las primeras etapas de la espermiogénesis (Courtens y col., 1991) observándose con una apariencia fibrillogranular (Lalli y Clermont, 1981).

La teca perinuclear está constituida por diversas proteínas como son la calmodulina (Kann y col., 1991; Hernández y col., 1994), la actina (Clarke y Yanagimachi, 1978; Tamblyn, 1980; Flaherty y col., 1988; Fouquet y col., 1990, 1991; Volg y col., 1993; Paranko y col., 1994), la espectrina (Kann y col., 1993; Yagi y Paranko, 1995), la calicina (Hess y col., 1993; von Bulow y col., 1995;

Paranko y col., 1988), las proteínas de la banda multi-peptídica, (Paranko y col., 1988), la vimentina (Virtanen y col., 1984), las cilicinas I y II (Hess y col., 1993, 1995) y la PERF 15 (Oko y Morales 1994; Korley y col., 1997), entre otras.

A la TP se le atribuyen las siguientes funciones: 1) proteger al núcleo del espermatozoide contra agentes descondensantes externos (Sutovsky y col., 1997); 2) reducir el citoplasma durante la formación del espermatozoide y comprimir el citoplasma residual (Longo y col., 1987); 3) actuar como cemento entre el núcleo y las estructuras que lo cubren (Courtens y col., 1976; Courtot, 1991); 4) dar la forma a la cabeza durante la espermiogénesis (Oko y Maravei, 1994, 1995; Kimura y col., 1998); 5) estabilizar el acrosoma del espermatozoide (Oko y Maravei, 1994, 1995); 6) mantener los dominios, en la superficie de la región ecuatorial, de las membranas acrosomal externa y plasmática, durante la reacción acrosomal (Virtanen y col., 1984); 7) participar en la penetración del espermatozoide a las envolturas del óvulo (Courtens y col., 1976), 8) así como en la activación del huevo (Kimura y col., 1998) y 9) en el ingreso del núcleo espermático al óvulo durante el proceso de fecundación (Kimura y col., 1998).

LA SUBESTRUCTURA DE LA TECA PERINUCLEAR

La teca perinuclear presenta una subestructura localizada a manera de cinturón en la porción apical de la capa postacrosomal. En el espermatozoide del cobayo esta subestructura presenta un arreglo a manera de pestañas, con proyecciones de 237 ± 5.1 nm, apoyadas sobre una de las dos líneas paralelas continuas de la base de la subestructura separadas por un espacio de 66 ± 2.2 nm. Por inmunolocalización con oro coloidal la presencia de actina-F en la base de

la subestructura ha sido observada y su función valorada por el tratamiento de los espermatozoides con faloidina, y citocalasina-D (Juárez-Mosqueda y Mújica, 1999).

La subestructura de la teca perinuclear también ha sido descrita en el espermatozoide del conejo (Koehler, 1970), del toro (Olson y col., 1983), del borrego (Watson y col., 1995) y del cerdo (Juárez-Mosqueda y Mújica, 1999) siendo su morfología específica de especie.

Durante la maduración epididimal, evento en el que los espermatozoides adquieren la capacidad fertilizante y la motilidad (Courot, 1981), la subestructura se encuentra ausente en los espermatozoides de la cabeza del epidídimo del cobayo, sin embargo la mayoría de las células obtenidas del cuerpo del epidídimo ya presentan la subestructura y ésta se localiza en todos los espermatozoides de la cauda del epidídimo y del ducto deferente. En los espermatozoides del cobayo, obtenidos de la cabeza del epidídimo la subestructura se encuentra ausente pero en los espermatozoides obtenidos del cuerpo del epidídimo la mayoría la presentan, aunque algunos la presentan en etapa de formación y se observa de manera constante en los espermatozoides obtenidos de la cauda del epidídimo y del ducto deferente. Se ha observado que la subestructura se conserva en los espermatozoides capacitados, mientras que en los espermatozoides capacitados pero con reacción acrosomal ya sea inducida o espontánea la subestructura se pierde (Juárez-Mosqueda y Mújica, 1999).

Juárez-Mosqueda y Mújica (1999) reportaron que la subestructura de la teca perinuclear se perdió en los espermatozoides del ducto deferente del cobayo

tratados con Brij, cuando fueron resuspendidos tanto en medio mínimo de cultivo (MCM) como en cloruro de sodio-bicarbonato.

CAPACITACION Y REACCION ACROSOMAL

Previo a la fertilización, los espermatozoides deben realizar dos procesos fisiológicos, el de su capacitación y la reacción acrosomal. El primero consiste en una serie de cambios que experimenta el espermatozoide en el tracto reproductor de la hembra y que le permiten continuar las modificaciones de la reacción acrosomal (Amann y col., 1993; Visconti y col., 1995). Con la capacitación se muestran los siguientes cambios: 1) la disminución en la rigidez de la membrana plasmática asociada con la pérdida de colesterol; 2) la redistribución de los fosfolípidos presentes en la membrana plasmática; 3) la hiperpolarización de la membrana plasmática y 4) modificaciones en su metabolismo y en las concentraciones iónicas (Saling y col., 1979; Toshimori, 1998; Patrat y col., 2000).

Una vez capacitados, los espermatozoides pueden continuar con la reacción acrosomal, proceso de exocitosis regulada, dependiente de calcio externo (Patrat y col., 2000). Durante la reacción acrosomal se fusionan la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa en múltiples puntos focales, lo cual causa la liberación del contenido acrosomal.

La reacción acrosomal también prepara al espermatozoide para que su membrana plasmática, sobre la región ecuatorial, sea reconocida por la membrana plasmática del óvulo y lleve a cabo la fertilización (Yanagimachi y Noda, 1970). Como se mencionó anteriormente, la subestructura desaparece durante la reacción acrosomal del espermatozoide del cobayo, además de que disminuye la cantidad

de proteínas presentes en la TP quedando ésta aparentemente abierta, menos electrodensa, en el nivel donde se localizaba la subestructura (Juárez, 1995).

La capacitación y la reacción acrosomal de los espermatozoides del cobayo pueden realizarse *in vitro* mediante la incubación de los gametos en el medio mínimo de cultivo suplementado con piruvato y lactato (MCM-PL) (Rogers y Yanagimachi, 1975); basta incubar a los espermatozoides en ese medio para que se capaciten y gradualmente presenten la reacción acrosomal espontánea. Si se requiere una reacción acrosomal sincrónica, ésta se consigue tratando a los espermatozoides capacitados 20 min, en el medio MCM-PL, con un ionóforo de calcio como el A23187 (Green, 1978; Jamil y White, 1981; Allen y Green, 1995).

CONDENSACION Y DESCONDENSACION DEL NUCLEO ESPERMATICO

El núcleo espermático está altamente estructurado, es muy estable y por lo tanto resistente al efecto de las endonucleasas (Dean, 1983). En parte esta estabilidad está dada por las protaminas (proteínas descubiertas en 1869 por Miesher en los espermatozoides del salmón). Las protaminas son proteínas básicas y específicas del espermatozoide, y se les considera responsables de la condensación del núcleo espermático. Muestran un peso molecular de 6,200 a 7,636 daltons, están compuestas de 47 a 57 aminoácidos, de los cuales la arginina se encuentra en un 50% (Alfert, 1956; Monesi, 1965) y la cisteína en un 12%, este último aminoácido puede formar puentes disulfuro (Balhorn, 1982). Las protaminas han sido descritas en los espermatozoides de los moluscos (Colom y Subirana, 1979), de los peces, del toro, del carnero, del cerdo, del conejo, de las

aves, de la rata, del ratón, del caballo y del ser humano. En estas tres últimas especies se han encontrado dos tipos de protaminas (McKay y col., 1986).

Durante la espermiogénesis, el núcleo espermático se involucra en una serie de transformaciones a través de las cuales las histonas (proteínas ricas en lisina y arginina) y las proteínas no histonas de la cromatina son reemplazadas por proteínas de transición y éstas a su vez por uno o más tipos de protaminas, localizándose tanto en el surco mayor como en el surco menor de la doble helice del ADN (Calvin y Bedford, 1971; Balhorn, 1982). Durante este proceso se da la formación de puentes disulfuro entre cisteínas, lo cual continúa durante el tránsito del espermatozoide por el epidídimo, en el que se establecen la mayor cantidad de puentes disulfuro intra e intermoleculares (Bedford y col., 1973 y 1974). Estas modificaciones en el arreglo nuclear, empaquetan muy densamente al ADN y detienen los procesos de transcripción y replicación (Monesi y col., 1978; Poccia, 1986).

La teca perinuclear también participa en la estabilidad del núcleo espermático, ya que ésta al rodearlo casi por completo, lo protege contra agentes descondensantes externos (Sutovsky y col, 1997). La TP también incrementa su estabilidad estructural por la formación de puentes disulfuro entre sus proteínas durante la maduración del espermatozoide en el epidídimo (Calvin y Bedford, 1971).

Poco después de la fusión de la membrana plasmática del espermatozoide con la del huevo, la cabeza del espermatozoide es incorporada al citoplasma del huevo, y se inicia en ella una serie de cambios morfológicos como: 1) la pérdida y dispersión de la hoja postacrosomal de la TP, 2) la ruptura de la envoltura nuclear

(Jamil 1984), 3) la descondensación de la cromatina, 4) la separación de la membrana acrosomal interna, y 5) la formación del pronúcleo masculino (Usui, 1996).

In vivo, durante la descondensación nuclear del espermatozoide, las protaminas son reemplazadas por histonas provenientes del citoplasma del huevo, para que se forme el pronúcleo masculino. En los anfibios del género *Xenopus*, le ha sido atribuida a la nucleoplasmina, proteína ácida abundante en los huevos maduros, la acción de remoción de las protaminas (Mills y col., 1980; Philpott y col., 1991; Blank y col., 1992). En los mamíferos se ha identificado al glutatión reducido como el agente responsable de la reducción de los puentes disulfuro creados entre las protaminas ya que se encuentra de manera abundante en el citoplasma de los ovocitos maduros (Usui, 1996; Sutovsky y Schatten, 1997).

El núcleo del espermatozoide maduro es resistente a la acción directa de varios agentes químicos, detergentes y enzimas. Sin embargo se ha demostrado que *in vitro*, el núcleo espermático puede descondensarse por el tratamiento de las células con un agente reductor de disulfuros y SDS, con tioglicolato o bien combinando un agente reductor de disulfuros con proteasas (Calvin y Bedford, 1971; Bedford y col., 1973; Gall y Ohsumi, 1976; Usui y Yanagimachi, 1976). El primero reduce los puentes disulfuro, formados durante la maduración epididimal, que estabilizan a las estructuras nucleares y el segundo el SDS actúa sobre las membranas celulares (Calvin y Bedford, 1971). Gall y Ohsumi (1976) lograron la descondensación *in vitro* del núcleo espermático de espermatozoides del ratón combinando tratamientos con proteasas y ditriotreitol (DTT), y reportaron que la región postacrosomal del espermatozoide tiene una mayor susceptibilidad al

tratamiento con tripsina y DTT, conservando la región subacrosomal una mayor integridad.

LA HEPARINA COMO AGENTE DESCONDENSANTE

La heparina *in vitro*, produce la descondensación del núcleo espermático al competir con el ADN por las protaminas, removiéndolas y ocasionando la descompactación del ADN (Cook y Aikawa, 1973; Bertanzon y col., 1981). El efecto descondensante de la heparina sobre el núcleo espermático ha sido estudiado en los espermatozoides del erizo de mar, del bovino, del ratón, del cerdo, del conejo y de la rata (Delgado y col., 1982). Este efecto también ha sido observado en los espermatozoides completos del ser humano mostrando un daño severo de la membrana citoplasmática (Reyes y col., 1989; Jager y col., 1990).

EL DITRIOTREITOL COMO AGENTE DESCONDENSANTE

En 1964, Cleland demostró la actividad del ditriotreitol (DTT) como agente reductor de los puentes disulfuro y Calvin y Bedford (1971) lograron descondensar el núcleo de los espermatozoides de diversas especies combinando la acción del DTT seguido del tratamiento con un detergente aniónico, el dodecil sulfato de sodio (SDS), observando que los espermatozoides que se encontraban en tránsito por la cabeza del epidídimo se descondensaban más rápidamente que los espermatozoides maduros. Por otra parte, Gall y Ohsumi (1976), resaltaron la importancia del DTT para lograr la descondensación *in vitro* del núcleo espermático en espermatozoides maduros de la rata, del ratón, del cobayo y del conejo.

Juárez-Mosqueda y Mújica (1999) estudiaron el efecto del tratamiento con DTT sobre la morfología de la teca perinuclear y observaron que el DTT a una concentración de 15 mM no tiene efecto alguno sobre la teca perinuclear ni sobre la subestructura, sin embargo concentraciones de 22.5 mM y 50 mM provocaron cambios en la región subacrosomal, sin alterar la subestructura de la teca perinuclear, lo que indica que la estabilidad de la subestructura de la TP no depende de los puentes disulfuro.

El propósito de esta investigación es el de profundizar en los mecanismos de estabilidad de la subestructura de la teca perinuclear, que repercuten en la descondensación del núcleo espermático.

OBJETIVO PRINCIPAL

- Definir si la descondensación del núcleo espermático depende de la integridad de la teca perinuclear madura.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Valorar si la combinación en diferentes concentraciones del ditriotritol y de la heparina afectan el tiempo necesario para desestabilizar a la teca perinuclear y a la subestructura de la teca perinuclear y así permitir la descondensación del núcleo espermático.
- Valorar la descondensación *in vitro* del núcleo de espermatozoides que se encuentran en procesos fisiológicos en donde se modifica la estabilidad de la teca perinuclear como es el caso de la reacción acrosomal.
- Valorar la descondensación *in vitro* del núcleo de espermatozoides previamente tratados con faloidina.

HIPOTESIS PRINCIPAL

- La integridad de la teca perinuclear madura evita la descondensación del núcleo espermático.

HIPOTESIS PARTICULARES

- La estabilidad *in vitro* de la teca perinuclear se afecta en diferentes grados con el uso combinado de un reductor de enlaces disulfuro y de un agente que facilita la extracción de las proteínas de la teca perinuclear y de las proteínas nucleares (protaminas) al competir con el ADN por ellas.
- La estabilización de la actina-F presente en la base de la subestructura de la teca perinuclear le confiere al núcleo espermático mayor resistencia a la descondensación.

MATERIAL Y METODOS

1. Reactivos.

El piruvato de sodio, el ácido láctico, el ionóforo A23187, el trizma-base, el paraformaldehído, el glutaraldehído, el DL-ditiotreitol (DTT), la faloidina (*Amanita phalloides*), la heparina (sal sódica grado II, de mucosa intestinal de cerdo), fueron adquiridos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO/USA), el Ficoll® 400 fue comprado a Pharmacia Biotech (Suiza) y el Brij 36-T a Canamex, S.A. (México).

2. Soluciones.

Soluciones utilizadas: Cloruro de sodio 154 mM (**NaCl**). El medio mínimo de cultivo suplementado con piruvato y lactato (**MCM-PL**) (NaCl 102 mM CaCl₂ 2H₂O 1.71 mM, NaHCO₃ 25.07 mM, piruvato de sodio 0.25 mM, ácido láctico 20 mM, pH 7.8). Amortiguador de tris 50 mM pH 9. Solución de DTT fue preparada a una concentración de 90 mM disuelto en el amortiguador de tris (**DTT-Tris**). Solución de Brij 36-T al 10% (**Brij-10**). Solución de heparina, tenía 1000 USP, disuelto en NaCl. La faloidina se preparó a una concentración de 59 µM. La solución del ionóforo A23187 se utilizó a una concentración de 1.3 µM. El ácido fosfotúngstico se preparó al 0.02% y el amortiguador salino de fosfatos (**PBS**) contenía NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, NaH₂PO₄ 9.6 mM, KH₂PO₄ 1.4 mM y fue ajustado a pH 7.4).

3. Obtención de los espermatozoides.

Los testículos, junto con los epidídimos y ductos deferentes de cobayos adultos (*Cavia porcellus*) fueron removidos, previa eutanasia con éter sulfúrico

medicinal en una cámara de gases por saturación del aire. Se disecaron los ductos deferentes y fueron perfundidos con 3 ml de NaCl. Los espermatozoides obtenidos se lavaron por resuspensión-centrifugación dos veces en un volumen de 3 ml de la misma solución. La concentración final de espermatozoides se ajustó a 35×10^6 células/ml mediante la cuenta en una cámara de Neubauer.

4. Capacitación *in vitro* de los espermatozoides, para la inducción sincrónica de la reacción acrosomal.

Los espermatozoides a una concentración de 35×10^6 células/ml fueron incubados en MCM-PL durante 20 min a 37° C. Durante el transcurso de la incubación se obtuvieron muestras alícuotas y se observaron en un microscopio fotónico marca Leica modelo LS con la finalidad de evaluar la motilidad espermática. La reacción acrosomal se indujo por la adición del ionóforo de calcio A23187 ($1.3 \mu\text{M}$ concentración final) manteniéndose la incubación durante 15 min más. Enseguida, para separar a los espermatozoides capacitados de los espermatozoides con reacción acrosomal, .2 ml de la suspensión fueron colocados sobre un gradiente discontinuo de Ficoll de 10, 20 y 30% (1 ml de cada una de las concentraciones en NaCl). El gradiente de Ficoll con las muestras se centrifugó a temperatura ambiente durante 6 minutos a 1000 rpm, en una centrífuga clínica. De la interfase de Ficoll 20-30% se obtuvieron los espermatozoides con reacción acrosomal ajustando la concentración espermática de la muestra al valor inicial. Una muestra alícuota se observó al microscopio de luz, para corroborar la pérdida del acrosoma, otras muestras se prepararon para su observación al microscopio electrónico de transmisión (sección 7).

5. Exposición de la superficie de la teca perinuclear del espermatozoide.

La membrana plasmática, el acrosoma y la envoltura nuclear de los espermatozoides fueron solubilizados con la solución de Brij 36-T al 10% (0.14 ml/ml de la muestra espermática). Las muestras fueron posteriormente incubadas a temperatura ambiente durante 5 minutos y después de lo cual se lavaron tres veces con NaCl por resuspensión-centrifugación. Las muestras que recibieron este tratamiento fueron: 1) los espermatozoides maduros no capacitados y 2) los espermatozoides capacitados y con reacción acrosomal sincrónica.

Muestras testigo de este procesamiento se prepararon para su observación al microscopio electrónico de transmisión (sección 7).

6. Tratamientos

6.1) Tratamiento de los espermatozoides maduros con un agente estabilizante de actina F.

Los espermatozoides maduros no capacitados y con la teca perinuclear expuesta fueron resuspendidos en NaCl e incubados con faloidina, a una concentración final de 59 μM durante 5 minutos a 37°C y posteriormente lavados tres veces con NaCl por resuspensión-centrifugación.

6.2) Tratamiento de los espermatozoides con agentes descondensantes.

Para determinar la capacidad protectora, que la teca perinuclear tiene sobre el material genético, mediante la valoración de la descondensación del núcleo espermático, varios protocolos de descondensación fueron aplicados a las muestras de espermatozoides con teca expuesta de: (1) espermatozoides maduros no capacitados, (2) de espermatozoides capacitados con reacción acrosomal y (3) de espermatozoides maduros tratados con faloidina.

Los tratamientos realizados sobre los espermatozoides con teca expuesta fueron los siguientes:

6.2.1) Tratamiento con DTT.

Muestras de las características 1, 2 y 3 señaladas en el primer párrafo fueron resuspendidas en MCM-PL o en NaCl, y adicionadas con DTT a una concentración final de 1.5 mM o de 5 mM y se incubaron a 37°C. Muestras alícuotas de las suspensiones tratadas fueron tomadas a tiempos preestablecidos (15, 30, ó 45 seg, 1, 2, 3, 10, ó 30 min y 1 hora), y se procesaron para su observación al microscopio electrónico de transmisión.

6.2.2) Tratamiento con Heparina.

Muestras de tipo 1, 2 y 3 resuspendidas en MCM-PL o en NaCl, fueron adicionadas con 5 USP de heparina y se incubaron a 37°C. A tiempos preestablecidos (15, 30, ó 45 seg, 1, 2, 3, 10, ó 30 min y 1 hora), muestras alícuotas fueron tomadas y se procesaron para su observación al microscopio electrónico de transmisión.

6.2.3) Tratamiento con DTT-Heparina.

Muestras obtenidas de 1, 2 y 3 resuspendidas en MCM-PL o en NaCl, fueron incubadas en DTT (1.5 mM o 5 mM), en combinación con 5 USP de heparina y se incubaron a 37°C. Muestras alícuotas fueron tomadas a los mismos tiempos señalados arriba y se procesaron para su observación al microscopio electrónico de transmisión.

Cada uno de los tratamientos fueron realizados por triplicado.

7. Procesamiento de los espermatozoides para microscopía electrónica.

Las muestras de espermatozoides fueron procesadas en preparaciones completas para tinción negativa. Inmediatamente después de obtenidas las muestras fueron fijadas en fijador de Karnowsky durante 2-3 horas a 4°C. Las muestras fueron centrifugadas a 2500 rpm durante 3 min, lavadas con PBS y agua desionizada, dos veces en cada una y finalmente se resuspendieron en esta última. Una gota de cada muestra fue colocada sobre rejillas de cobre de 200 mesh, cubiertas con membranas de soporte de colodión-carbón. Las muestras fueron contrastadas con ácido fosfotúngstico al 0.02% en solución acuosa. Después de 3 min, las rejillas fueron lavadas en agua destilada. Las muestras fueron observadas al microscopio electrónico de transmisión en la unidad de microscopía electrónica de la FMVZ de la UNAM (Zeiss EM9) y otras en la unidad de microscopía electrónica del CINVESTAV del IPN (Jeol JEM-2000EX).

8. Procesamiento de los espermatozoides para microscopía fotónica.

Se realizaron frotis de las muestras de los espermatozoides y se tiñeron con hematoxilina de Harris. La observación se hizo en un microscopio fotónico Leica modelo LS con una cámara de video JVC modelo FY-770 adaptada a una PC Gateway con el software Automontage de Syncroscopy para el procesamiento digital de imágenes. La valoración del grado de descondensación se realizó de medidas realizadas a nivel de la región ecuatorial de las células con el empleo del programa de computo SigmaScan Pro 3.0 (Image Measurement Software, Jandel

Scientific). Cada muestra se analizó por triplicado y un mínimo de 20 células, en cada replica fue valorado; esto es 60 células mínimo por tratamiento.

9. Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos de las mediciones de la región ecuatorial de los espermatozoides fueron analizados estadísticamente mediante la prueba de comparación de medias de t de Student ($p < 0.05$).

RESULTADOS

Aunque en todos los experimentos los espermatozoides fueron resuspendidos tanto en cloruro de sodio isotónico como en el medio mínimo de cultivo (MCM), los resultados que enseguida se muestra son exclusivamente los obtenidos con las células suspendidas en NaCl. Los resultados obtenidos con los gametos resuspendidos en MCM fueron iguales.

1. Efecto del tratamiento con DTT.

Los espermatozoides maduros, los maduros estabilizados y los espermatozoides con reacción acrosomal, con la teca expuesta no mostraron modificaciones aparentes sobre la superficie de la TP por el tratamiento con cualquiera de las concentraciones de DTT utilizadas (1.5 mM y 5 mM) (Fig. 1). Los espermatozoides maduros y los maduros preincubados con faloidina conservaron a la subestructura de la TP. Por otra parte, los tres tipos de muestras fueron tratadas con 1.5 mM de DTT y fijadas al minuto y a los tres minutos de iniciado el tratamiento y en ellas se evaluó la longitud de la región ecuatorial para cuantificar el hinchamiento (Fotografías (a) y (b) de las Figs. 2-4). No se registraron diferencias en el tamaño de las cabezas de los tres tipos de espermatozoides entre sí, después de ser tratados con DTT, ni cuando se compararon con el tamaño de sus respectivos controles sin tratar con DTT. En los tres tipos de muestras evaluadas antes y después de estos tratamientos, la longitud promedio de la región ecuatorial fue de 6.4 μm (Figs. 5-7).

2. Efecto del tratamiento con heparina.

Los resultados morfológicos después del tratamiento con 5 USP de heparina fueron similares a los obtenidos con el DTT en los mismos tiempos preestablecidos de evaluación (Fotografías (c) y (d) de las Figs. 2-4).

Ni el tratamiento con el DTT solo ni la heparina sola fueron capaces de hinchar las cabezas espermáticas; ni aun en los espermatozoides con su teca desestabilizada por la reacción acrosomal (Figs. 5-7).

3. Efecto del tratamiento combinado DTT y heparina.

3.1 En espermatozoides maduros con teca expuesta.

Cuando los espermatozoides maduros incubados en NaCl o MCM-PL fueron tratados con 1.5 mM de DTT y 5 USP de heparina, conservaron intacta la subestructura de la TP hasta los 30 segundos de iniciada la incubación. A partir de los 45 segundos, las muestras ya no presentaron la subestructura de la TP (Fig. 8c). Adicionalmente, la región subacrosomal de la TP se observó más electrolúcida a partir de los 45 segundos de tratamiento, siendo esta característica intensificada al transcurrir el tiempo de incubación. Por otra parte, la región postacrosomal conservó una apariencia más electrodensa, principalmente en su porción distal cercana a la inserción del flagelo al núcleo (Fig. 8e).

Para valorar el grado de la descondensación nuclear se realizaron mediciones de la longitud de la región ecuatorial de la cabeza espermática en los espermatozoides teñidos con hematoxilina (Fotografías (e) y (f) de la Fig 3). Los espermatozoides maduros con la teca expuesta presentaron una longitud promedio de 6.4 μm . La incubación con DTT-heparina mostró una tendencia a

incrementar la longitud de la región ecuatorial hasta alcanzar una longitud de 6.53 μm a los 3 min de la incubación, sin embargo, esta longitud no fue estadísticamente diferente a la de los controles (Fig. 5).

3.2 En espermatozoides con reacción acrosomal.

Con el propósito de establecer las mejores condiciones para observar el efecto del tratamiento con DTT-heparina sobre la subestructura de la teca perinuclear, los espermatozoides con la teca desestabilizada fueron incubados en la mezcla DTT-heparina (5 mM-5 USP) durante tiempos variables desde 15 seg hasta 30 min. Desde el primer minuto de tratamiento el hemisferio apical de la teca perinuclear ya se observó muy desorganizado (Fig 9a) y a los 10 minutos sólo se observaron flagelos en las preparaciones (Fig. 9b). Observando que a esas concentraciones de DTT-heparina, el tratamiento es muy drástico, se decidió ensayar una menor concentración de DTT (1.5 mM) con el resultado de que la descondensación nuclear fue gradual (Fig 9c y 9d). Este último tratamiento aplicado por 3 min fue seleccionado para valorar el hinchamiento de las cabezas de los espermatozoides.

La figura 10a muestra que la reacción acrosomal produce "per se" la desestabilización de la teca perinuclear en la región ecuatorial y la desaparición de la subestructura de la teca. El tratamiento con DTT-heparina, provocó en la región subacrosomal de los espermatozoides, una pérdida aparente de material estructural; ya que la región se observó más electrolúcida; esto ocurrió a partir de los 45 segundos de tratamiento y amplificándose al transcurrir el tiempo de incubación. Este resultado es similar a lo observado en los espermatozoides

maduros (Fig. 8). Desde los 45 segundos de incubación la región postacrosomal presentó una región electrodensa, principalmente en su porción basal cercana a la inserción del flagelo (Fig. 11c). A los 3 minutos de incubación ambas regiones (subacrosomal y postacrosomal) mostraron la misma apariencia electrolúcida (Fig. 11f).

En este tipo de espermatozoides, la longitud promedio de la región ecuatorial, fue de 6.5 μm a los 15 seg de tratamiento observándose posteriormente un incremento continuo hasta obtener una longitud de 8.03 μm a los 3 minutos de tratamiento (Fig. 6). El incremento fue estadísticamente significativo desde los 45 seg de incubación. Como ya se mencionó, la longitud de la misma zona en las muestras testigo fue de 6.4 μm (Fig. 6).

3.3 En espermatozoides maduros estabilizados con faloidina.

El tratamiento con DTT-heparina de los espermatozoides maduros con teca expuesta, tratados previamente con faloidina (59 μM) e incubados en NaCl o MCM-PL no produjo la pérdida de la subestructura de la teca perinuclear durante el tiempo del tratamiento (3 min) (Fig. 11). Esas muestras también presentaron la región subacrosomal electrolúcida a los 45 seg y 1 min de incubación. A los 2 min de tratamiento, ambas regiones de la TP mostraron la misma apariencia electrolúcida. (Fig. 11e). Sin embargo, los núcleos después de 3 min de incubación se observaron con una morfología inusual ya que no presentaron un hinchamiento en forma redonda, en su lugar la cabeza en descondensación se plegó sobre sí misma (Fig. 11f). Una característica particular fue que en la región de la base de la subestructura se observaron zonas electrolúcidas y electrodensas

de manera alternada y en cada punto electrodenso se encontraba insertada una de las pestañas de la subestructura (Fig. 12).

Como lo muestran las fotografías 4e y 4f y las gráficas 7 y 13 la longitud promedio de la región ecuatorial no fue modificada por el tratamiento con DTT-heparina conservando un valor de $6.4 \mu\text{m}$, similar al de las muestras control que no fueron tratadas con la mezcla de reactivos.

DISCUSION

En este trabajo se valoró el posible papel protector de la teca perinuclear, sobre la desestructuración nuclear, tomando como referencia la estabilidad de la subestructura y la morfología de la teca perinuclear, así como el hinchamiento de la cabeza espermática. La teca perinuclear es la principal barrera, que impide la descondensación de la cromatina espermática (Sutovsky y col.,1997), y se encuentra estabilizada por puentes disulfuros intra e intermoleculares entre las proteínas que la forman (Bellvé y O'Briend, 1983).

En este estudio, el tratamiento solamente con DTT (un agente reductor de disulfuros) no produjo ningún cambio aparente, ni en la morfología de la teca perinuclear ni en la subestructura, de los diferentes tipos de espermatozoides empleados. Nuestros resultados coinciden con los reportados por Sutovsky y col. (1997), quienes comunicaron que no es suficiente el tratamiento con un agente reductor de puentes disulfuro, para remover a la teca perinuclear.

El efecto del DTT a las dos dosis utilizadas (1.5 y 5 mM) sobre la integridad de la teca, valorada al microscopio electrónico, concuerda con los resultados obtenidos por Juárez-Mosqueda y Mújica, (1999) quienes observaron que el tratamiento con concentraciones hasta 50 mM de DTT, no produjo alteraciones en la morfología de la subestructura de la teca perinuclear de espermatozoides maduros del cobayo con la teca perinuclear expuesta.

El núcleo espermático dentro del citoplasma del ovocito debe ser descondensado para dar origen al pronúcleo masculino. Valencia y col. (1984) señalan, que en el ovocito existen glicosaminoglicanos sulfatados y que

probablemente éstos participan en la descondensación *in vivo* del núcleo espermático, a través de una competencia entre las cargas negativas del ADN y de los glicosaminoglicanos por las cargas positivas de las protaminas (Delgado y col., 1982; Montag y col., 1992). Los estudios *In vitro* han utilizado a la heparina para la extracción de las protaminas del núcleo espermático y lograr así su descondensación (Delgado y col., 1982; Reyes y col., 1989; Montag y col., 1992), y recientemente se ha reportado que la heparina, a una concentración de 250 USP, extrae proteínas de la TP del espermatozoide maduro del cobayo (Juárez 1995). Nuestros resultados muestran que el tratamiento con heparina (5 USP), de los diferentes tipos de espermatozoides cuya teca difiere en estabilidad, no produjo modificaciones aparentes en la morfología de la teca perinuclear durante los diferentes tiempos de incubación evaluados. De acuerdo con Delgado y col. (1982) y Montag y col (1992), para que la heparina interaccione con las protaminas se requiere que el núcleo espermático se encuentre sin teca y sin membrana nuclear. En nuestro modelo experimental, la teca perinuclear siempre estuvo presente (normal o parcialmente desestabilizada en los espermatozoides con RA y normal y estabilizada por la incubación con faloidina). Por lo que el efecto nulo de la heparina sobre el hinchamiento nuclear podría sugerir que la teca perinuclear actúa como una barrera impermeable a la heparina, al menos en la concentración de heparina utilizada en nuestro estudio, lo que confiere a la teca la función de protección del núcleo para evitar la acción de agentes exógenos que puedan desestructurar a la cromatina.

En las investigaciones realizadas por algunos autores para descondensar el núcleo espermático desnudo (carente de teca) de algunos mamíferos, se ha

utilizado la combinación de dosis altas tanto de DTT (500 mM) como de heparina (170 USP) (Jager y col., 1990; Ward y Coffey, 1991), en tiempos de incubación prolongados (hasta una hora). En nuestro modelo de núcleo espermático con teca expuesta, la descondensación gradual y controlada de la cromatina por el uso de bajas concentraciones de DTT y de heparina resultó ventajosa comparada con los protocolos más agresivos utilizados por los otros investigadores.

La presencia de una teca perinuclear normal evitó la descondensación del núcleo, valorada a los tres minutos de tratamiento, mientras que una teca alterada y carente de la subestructura, como la presentada por los espermatozoides con RA, permitió un notable hinchamiento nuclear y una pérdida muy aparente de material de la teca. Por el contrario, el pretratamiento con la faloidina estabilizó a la subestructura y evitó el leve hinchamiento producido por el tratamiento con DTT-heparina.

El efecto descondensante de la combinación DTT-heparina en el núcleo con la teca expuesta, podría explicarse al sugerir que primeramente el DTT actúa sobre los puentes disulfuro de las proteínas de la teca perinuclear, lo cual facilitaría la consiguiente descondensación nuclear. Estos resultados coinciden con lo reportado por Yanagimachi y Noda (1970), quien cita que es necesaria la pérdida de la TP para la descondensación adecuada del núcleo espermático, y que posteriormente sea la heparina quien extraiga proteínas del núcleo espermático, coincidiendo con lo reportado por Reyes y col. (1989), quienes lograron descondensar el núcleo de los espermatozoides con el empleo de la heparina.

Adicionalmente, la morfología del núcleo con la teca expuesta durante la descondensación, difiere de la morfología que presentan los núcleos espermáticos desnudos al ser descondensados exclusivamente por la heparina (Ocampo, 1995). En éstos el hinchamiento ocurre en los polos y a nivel de la región ecuatorial queda un cinturón que los constriñe.

De acuerdo con Yanagimachi, 1994 y Yanagimachi y Noda, 1970 la hoja postacrosomal de la teca perinuclear es la región que desaparece más rápidamente, en el citoplasma del huevo. En nuestra investigación fueron las cabezas de los espermatozoides con reacción acrosomal las más susceptibles al tratamiento combinado (DTT-heparina). La reacción acrosomal produjo la pérdida de proteínas de la teca perinuclear y la desaparición de la subestructura de la teca. La reacción acrosomal que remueve la subestructura de la teca facilitó *in vitro* la acción de la mezcla DTT-heparina. Se podría pensar que *in vivo*, la reacción acrosomal favorece el efecto de otros factores, sobre la teca; ya que *in vitro* el hemisferio apical de la teca fue el que primero se desestructuró mientras que *in vivo* es la región posacrosomal.

La identificación por Juárez-Mosqueda y Mújica, 1999 de la actina F (forma en la que la actina realiza la mayoría de sus funciones) (Korn, 1982; Bershadsky y Vasiliev, 1988) en la base de la subestructura de la teca perinuclear sugirió, que un agente que estabiliza a la actina F podría conferir resistencia a la teca. Un ejemplo de ese "agente estabilizador" sería la faloidina.

Nuestros resultados muestran que el tratamiento previo con faloidina mantuvo la subestructura de la teca y evitó la descondensación nuclear por la mezcla DTT-heparina. Estos resultados muestran que la presencia de la actina-F

es importante para mantener estable a la subestructura de la teca perinuclear y sugiere, además, la posibilidad de que la actina F estuviera localizada en toda la teca y no sólo en la base de la subestructura, por lo que la descondensación normal del núcleo espermático requeriría que el citoesqueleto de actina de la base de la subestructura fuera primero desestructurado, para facilitar la pérdida de la subestructura.

En conclusión, los resultados obtenidos en este trabajo indican que la subestructura de la teca perinuclear participa de manera importante en la estabilidad del núcleo espermático, ya que al mantenerse íntegra la teca perinuclear y su subestructura, el núcleo espermático se descondensa lentamente. Adicionalmente, nuestros resultados muestran la posible participación de la actina F en la estabilidad del núcleo espermático y futuras investigaciones son necesarias para dar luz a la participación de la actina F en la estructuración de dicho núcleo.

REFERENCIAS

- Alfert, M.** 1956. Chemical differentiation of nuclear proteins during spermatogenesis in salmon. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 2: 109-113
- Allen, C. A., and Grenn, D. P.L.** 1995. Monoclonal antibodies wich recognize equatorial segment epitopes presented de novo following the A23187-induced acrosome reaction of guinea pig. *J. Cell Sci.* 108: 767-777.
- Amann, R.P., Hammersted, R.H. and Verramachaneni, D.N.R.** 1993. The epididymis and sperm maturation. A perspective. *Reprod. Fertil. Dev.* 5: 361-381.
- Balhorn, R.** 1982. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J. Cell Biol.* 93: 298-305.
- Bedford, J.M., Bent, M. J., and Calvin, H.** 1973. Variations in the structural character and stability of the nuclear chromatin in morphologically normal human spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 33: 19-29.
- Bedford, J.M., and Calvin, H.I.** 1974. The occurrence and possible functional significance of -S-S-crosslinks in sperm heads, with particular reference to eutherian mammals. *J. Exp. Zool.* 188:137-156.
- Bellvé, A.R. and O' Briend, D.A.** 1983. The mammalian spermatozoon: Structure and temporal assembly. In Mechanism and control of mammalian fertilization. J.F Hartmann, editors. Acad. Pres. 56-137.
- Bershadsky, A.D. and Vasiliev, J.M.** 1988. Cytoskeleton. Plenum Press, N.Y. 298 pp.

- Bertanzon, F, Stevens, E.S., Toniolo, C., and Bonora, G.M.** 1981. Interaction of the three main components of clupeine with glycosamineglycans. *Int J. Pept. Protein. Res.* 18: 312-317.
- Blank, T., Trendelenburg, M., and Kleinschmidt, J. A.** 1992. Reactivation of DNA replication in erythrocyte nuclei by *Xenopus* egg extract involves energy-dependent chromatin decondensation and changes in histone phosphorylation. *Exp. Cell Res.* 202: 224-232.
- Calvin, H.I. and Bedford, J.M.** 1971. Formation of disulphide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 13:65 –75.
- Colom, J., and Subirana, J. A.** 1979. Protamines and related proteins from spermatozoa of molluscs. *Biochim. Biophys. Acta.* 581: 217-227.
- Cook, R.T., and Aikawa, M.** 1973. The effects of heparin on endogenous DNA polymerase activity of rat liver liver and chromatin fractions. *Exp. Cell. Res.* 78: 257-270.
- Courtot, A.M.** 1991. Presence and location of the 60 kDa calicin in human spermatozoa presenting postacrosomal sheath defects: preliminary results. *Mol. Reprod. Dev.* 28: 272 – 279.
- Clarke, G.N. and Yanagimachi, R.** 1978. Actin in mammalian sperm heads. *J. Exp. Zool.* 205: 125- 132.
- Courot, M.** 1981. Transport and maturation of spermatozoa in the epididymis of mammals. *Prog. Reprod. Biol.* 8: 67-79.
- Courtens, J.L., Courot, M. and Fléchon, J.E.** 1976. The perinuclear substance of boar, bull, ram and rabbit spermatozoa. *J. Ultrastruct. Res.* 57:54-64.

- Courtens, J.L., Biggiogera, M., Gabbiani, G. and Fakan, S.** 1991. The striated body: a new structure in the sperm head of the rabbit spermatozoon. *J Exp. Zool.* 259:128-137.
- Dean, J.** 1983. Decondensation of mouse sperm chromatin and reassembly into nucleosomes mediated by polyglutamic acid *in vitro*. *Dev. Biol.* 99: 210-216.
- Delgado, N. M., Reyes, R., Huacuja, L., Carranco, A., Merchant, H., and Rosado, A.** 1982. Decondensation of human sperm nuclei by glycosaminoglycan-sulfate from sea urchin egg. *J. Exp. Zool.* 224: 457-460.
- Fawcett, W.** 1975. The mammalian spermatozoon. *Dev. Biol.* 44: 394-436.
- Flaherty, S.P., Winfrey, V.P. and Olson, G.E.** 1988. Localization of actin in human, bull, rabbit and hamster sperm by immunoelectron microscopy. *Anat. Rec.* 221:599-610.
- Fouquet, J.P. and Kann, M.L.** 1994. The cytoskeleton of mammalian spermatozoa. *Biol. Cell.* 8:89-93.
- Fouquet, J.P., Kann, M.L. and Dadoune, J. P.** 1990. Immunoelectron microscopic distribution of actin in hamster spermatids and epididymal, capacitated and acrosome-reacted spermatozoa. *Tissue Cell.* 22:291-300.
- Gall, W.E. and Ohsumi, Y.** 1976. Decondensation of sperm nuclei *in vitro*. *Exp. Cell Res.* 102: 349-358.
- Green, D.P.L.** 1978. The induction of the acrosome reaction in guinea pig sperm divalent metal cation ionophore A23187. *J. Cell Sci.* 32: 137-151.
- Hernández, E.O., Trejo, R., Espinosa, A.M. and Mújica, A.** 1994. Calmoduline binding proteins in the membrane vesicles released during the acrosomal reaction

and in the perinuclear material in isolated acrosome reacted sperm heads. *Tissue Cell*. 26:849-865.

Hess, H., Heid, H. and Franke, W.W. 1993. Molecular characterization of mammalian calicin, a basic protein of the sperm head cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 122:1042-1052.

Hess, H., Heid, H., Zimbelmann, R. and Franke, W. 1995. The protein complexity of the cytoskeleton of bovine and human sperm heads: the identification and characterization of cyclicin II. *Exp. Cell Res.* 218: 174-182.

Jager, S., Wijchman, J., and Kremer, J. 1990. Studies on the decondensation of human, mouse, and bull sperm nuclei by heparin and other polyanions. *J. Exp. Zool.* 256. 315-322.

Jamil, K and White, I.G. 1981. Induction of acrosomal reaction in mammalian sperm with ionophore A23187 and calcium. *Arch. Androl.* 7:283-292.

Jamil, K. 1984. Plasma membrane cytoskeletal complex of the mammalian spermatozoa. *Arch Androl.* 13: 177-193.

Juárez, M. L. 1995. Identificación de la calmodulina de la superficie de la teca perinuclear en el espermatozoide del cuye no capacitado y en el capacitado con reacción acrosomal. Tesis de Maestría. Centro de Investigación y Estudios Avanzados. IPN. México, D.F.

Juárez-Mosqueda, M.L. and Mújica, A. 1999. A perinuclear theca substructure is formed during epididymal guinea pig sperm maturation and disappears in acrosome reacted cell. *J. Struct. Biol.* 128: 225-236

Kann, M.L., Feinberg, J., Rainteau, D., Dadoune, J.P., Weinman, S. and Fouquet, J.P. 1991. Localization of calmodulin in perinuclear structures of

spermatids and spermatozoa: a comparison of six mammalian species. *Anat. Rec.* 230:481-488.

Kann, M.L., Pradel, L.A., and Fouquet, J.P. 1993. Spectrin and ankyrin like proteins in spermatids and spermatozoa of the hamster and some other mammalian. *Mol. Reprod. Dev.* 33:51-61.

Kimura, Y., Yanagimachi, R., Kuretake, S., Borkiewicz, Perry, A.C.F. and Yanagimachi, H. 1998. Analysis of mouse oocyte activation suggests the involvement of sperm perinuclear material. *Biol. Reprod.* 58: 1407-1415.

Koehler, J.L. 1970. A freeze-etching study of rabbit spermatozoa with particular reference to head structures. *J. Ultrastruc. Res.* 33:598-614.

Korn, E.D. 1982. Actin polymerization and its regulation by proteins from nonmuscle cells. *Phys. Rev.* 62: 672-737.

Korley, R., Pouresmaeili, F. and Oko, R. 1997. Analysis of the protein composition of the mouse sperm perinuclear theca and characterization of its major protein constituent. *Biol. Reprod.* 57: 1426-1432.

Lalli, M., and Clermont, Y. 1981. Structural changes in the head component of the rat spermatid during late spermiogenesis. *Am. J. Anat.* 160:419-434.

Longo, F.J., Krohne, G., and Franke, W.W. 1987. Basic proteins of the perinuclear theca of mammalian spermatozoa and spermatids: a novel class of cytoskeletal elements. *J. Cell Biol.* 105:1105-1120.

McKay, D.J., Reneaux, B., and Dixon, G.H. 1986. Human sperm protamines. *Eur. J. Biochem.* 15: 5-8.

Mills, A.D., Laskey, R.A., Black, P., and De Robertis, E.M. 1980. An acidic protein which assembles nucleosomes *in vitro* is the most abundant protein in *Xenopus* oocyte nuclei. *J. Mol. Biol.* 139: 561-568.

Monesi, V. 1965. Synthetic activities during spermatogenesis in the mouse: RNA and protein. *Expl. Cell. Res.* 39: 197.

Monesi, V., Geremia, R., D'agostino, A., and Boitani, C. 1978. Biochemistry of male germ cell differentiation in mammals: RNA synthesis in meiotic and postmeiotic cells. *Curr. Top. Dev. Biol.* 12: 11- 36.

Montag, M., Tok, V., Liow, L. and Bongso, A.1992. In vitro decondensation of mammalian sperm and subsequent formation of pronuclei-like structures for micromanipulation. *Mol. Reprod. Dev.* 33:338-346.

Ocampo, J.L. 1995. Identificación de actina durante la descondensación *in vitro* de la cromatina del espermatozoide del cuy. Tesis de Maestría. Centro de Investigación y Estudios Avanzados. IPN. México, D.F.

Oko, R., and Clermont, Y. 1988. Isolation, structure and protein composition of the perforatorium of rat spermatozoa. *Biol. Reprod.* 39: 673-687.

Oko, R., and Clermont, Y. 1991. Origin and distribution of perforatorium proteins during spermatogenesis of the rat: an immunocytochemical study. *Anat. Rec.* 230:489-501.

Oko, R., and Maravei, D. 1994. Protein composition of the perinuclear theca of bull spermatozoa. *Biol. Reprod.* 50:1000-1014.

Oko, R., and Maravei, D. 1995. Distribution and possible role of perinuclear theca proteins during bovine spermiogenesis. *Microsc. Res. Tech.* 32: 520-532.

- Oko, R., Morales, C.R.** 1994. A novel testicular protein, with sequence similarities to a family of lipid binding proteins, is a major component of the rat sperm perinuclear theca. *Dev. Biol.* 166:235-245.
- Olson, G. E., Noland, T. D., Winfrey, V.P. and Garbers, D.L.** 1983. Substructure of the postacrosomal sheath of bovine spermatozoa. *J. Ultrastruct. Res.* 85: 204-218.
- Paranko, J., Yagy, A. and Kusisto, M.** 1994. Immunocytochemical detection of actin and 53 kDa polypeptide in the epididymal spermatozoa of rat and mouse. *Anat. Rec.* 240:516-527.
- Paranko, J., Longo, F., Potts, J., Krohne, G. and Franke, W.** 1988. Widespread occurrence of calicin, a basic cytoskeletal protein of sperm cells, in diverse mammalian species. *Differentiation* 38: 21-27.
- Patrat, C., Serres, C. and Jouannet, P.** 2000. The acrosome reaction in human spermatozoa. *Biol. Cell.* 92: 255-266.
- Philpott, A., Leno, G. H., and Laskey, R. A.** 1991. Sperm decondensation in xenopus egg cytoplasm is mediated by nucleoplasmin. *Cell* 65: 569-578.
- Poccia, D.L.** 1986. Remodelling of nucleoproteins during gametogenesis, fertilization and early development. *Int. Rev. Cytol.* 105:1-65.
- Reyes, R., Rosado, A., Hernández, O., and Delgado, N.M.** 1989. Heparin and glutathione: Physiological decondensing agents of human sperm nuclei. *Gamete Res.* 23. 39-47.
- Rogers, B.J., and Yanagimachi, R.** 1975. Retardation of guinea pig sperm acrosome reaction by glucose: the possible importance of pyruvate and lactate metabolism in capacitation and acrosome reaction. *Biol.Reprod.* 13: 568-575.

- Saling, P.M., Sowinski, J., and Storey, B.T.** 1979. An ultrastructural study of epididymal mouse spermatozoa binding to zona pellucida in vitro: sequential relationship to the acrosome reaction. *J. Exp. Zool.* 209: 220-238.
- Sutovsky, P., and Schatten, G.** 1997. Depletion of glutathione during bovine oocyte maturation reversibly blocks the decondensation of the male pronucleus and pronuclear apposition during fertilization *Biol. Reprod.* 56. 1503-1512.
- Sutovsky, P., Oko, R., Hewitson, L., and Schatten, G.** 1997. The removal of the sperm perinuclear theca and its association with the bovine oocyte surface during fertilization. *Dev. Biol.* 188:75-84.
- Tamblyn, T.M.** 1980 Identification of actin in boar epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod.* 22:727-734.
- Toshimori, K.** 1998. Maturation of mammalian spermatozoa: modifications of the acrosome and plasma membrane leading to fertilization. *Cell Tissue Res.* 293: 177-187.
- Usui, N., and Yanagimachi, R.** 1976 Behavior of hamster sperm nuclei incorporated into eggs at various stages of maturation, fertilization, and early development. *J. Ultrastruct. Res.* 57: 276-288
- Usui, N.** 1996. Morphological differences in nuclear materials released from hamster sperm heads at early stage of incorporation into immature oocytes, mature oocytes, or fertilized eggs. *Mol. Reprod. Dev.* 44: 132-140.
- Valencia, A., Wens, M.A., Merchant, H., Reyes, R. and Delgado. N.M.** 1984. Capacitation of human spermatozoa by heparin. *Archs. Androl.* 12: 109-113.
- Visconti, P.E., Bailey, J.L., Moore, G.D., Pan, D., Olds-Clarke, P., and Kopf, G.S.** 1995. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the

capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* 121: 1129-1137.

Virtanen, I., Badley, R.A., Pasivuo, R., Lehto, V.P. 1984. Distinct cytoskeletal domains revealed in sperm cells. *J. Cell Biol.* 99:1083-1091.

Volg, A.W., Genereux, K. and Pfeiffer, D.C. 1993. Filamentous actin detected in rat spermatozoa. *Tissue Cell.* 25:33-48.

Von Bulow, M., Heid, H., Hess, H. and Franke, W. 1995 Molecular nature of calicin, a major basic protein of the mammalian sperm head cytoskeleton. *Exp. Cell Res.* 219: 407-413.

Ward, W.S. and Coffey, D. 1991. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: Comparison with somatic cells. *Biol. Reprod.* 44:569-574.

Watson, P.F., Plummer, J.M., Jones, P.S. and Bredl, J.C.S. 1995. Localization of intracellular calcium during the acrosome reaction in ram spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 41: 513-520.

Yagi, A. and Paranko, J. 1985. Actin, α -actinin and spectrin with specific association with the postacrosomal and acrosomal domains of bovine spermatozoa. *Anat. Rec.* 241: 77-87.

Yanagimachi, R. Mammalian Fertilization. 1994. In *The Physiology of Reproduction*. E. Knobil and J.D. Neil, editors. Raven Press. Ltd. New York. 189-317.

Yanagimachi, R., and Noda, Y.D. 1970. Ultrastructural changes in the hamster sperm head during fertilization. *J. Ultrastr. Res.* 31: 465-485.

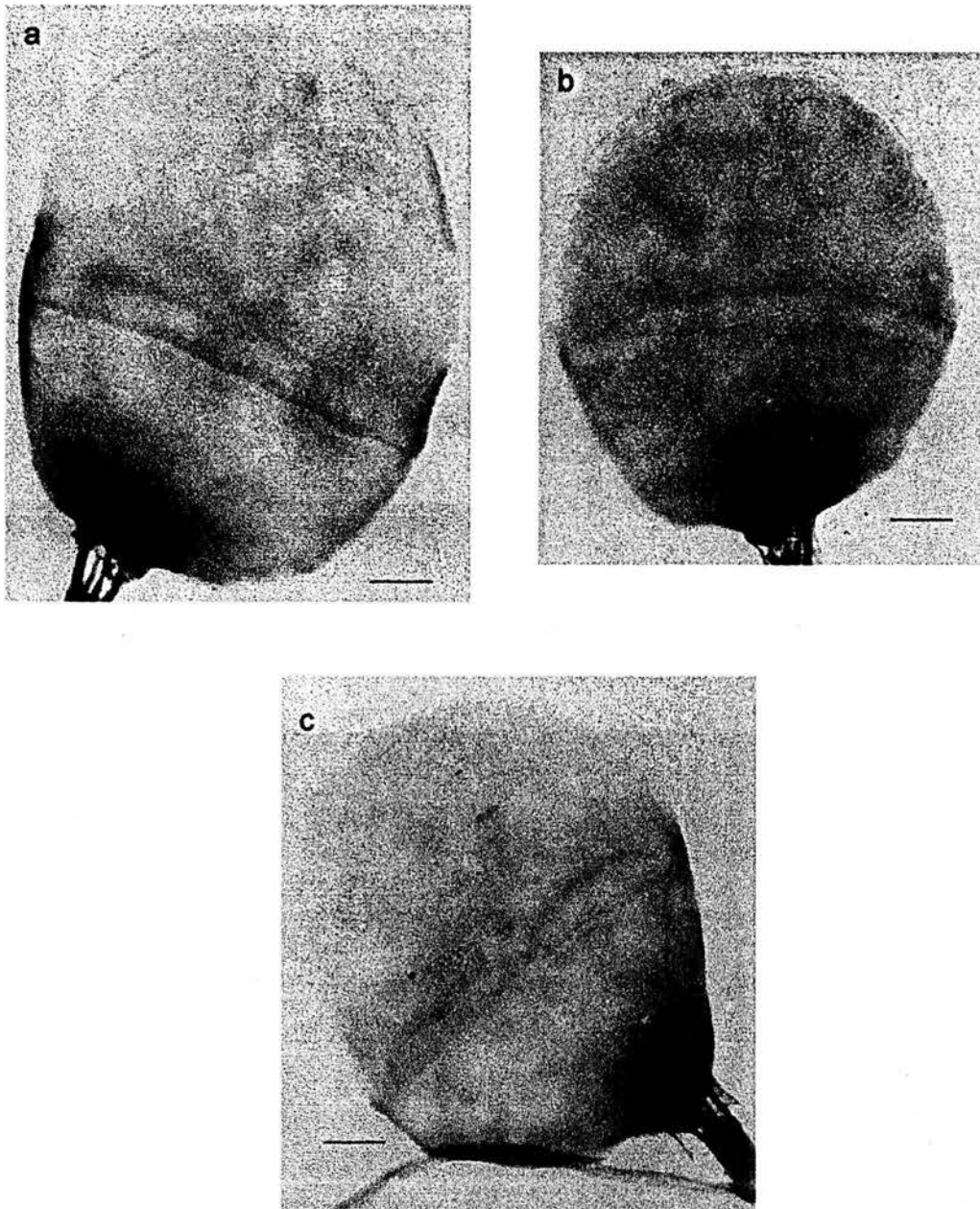


Figura 1. Microfotografías de espermatozoides resuspendidos en NaCl y tratados con DTT 5 mM durante 3 min (a) espermatozoide maduro desmembrado, (b) espermatozoide con reacción acrosomal inducida y (c) espermatozoide estabilizado con faloidina. La barra equivale a 1 μ m.

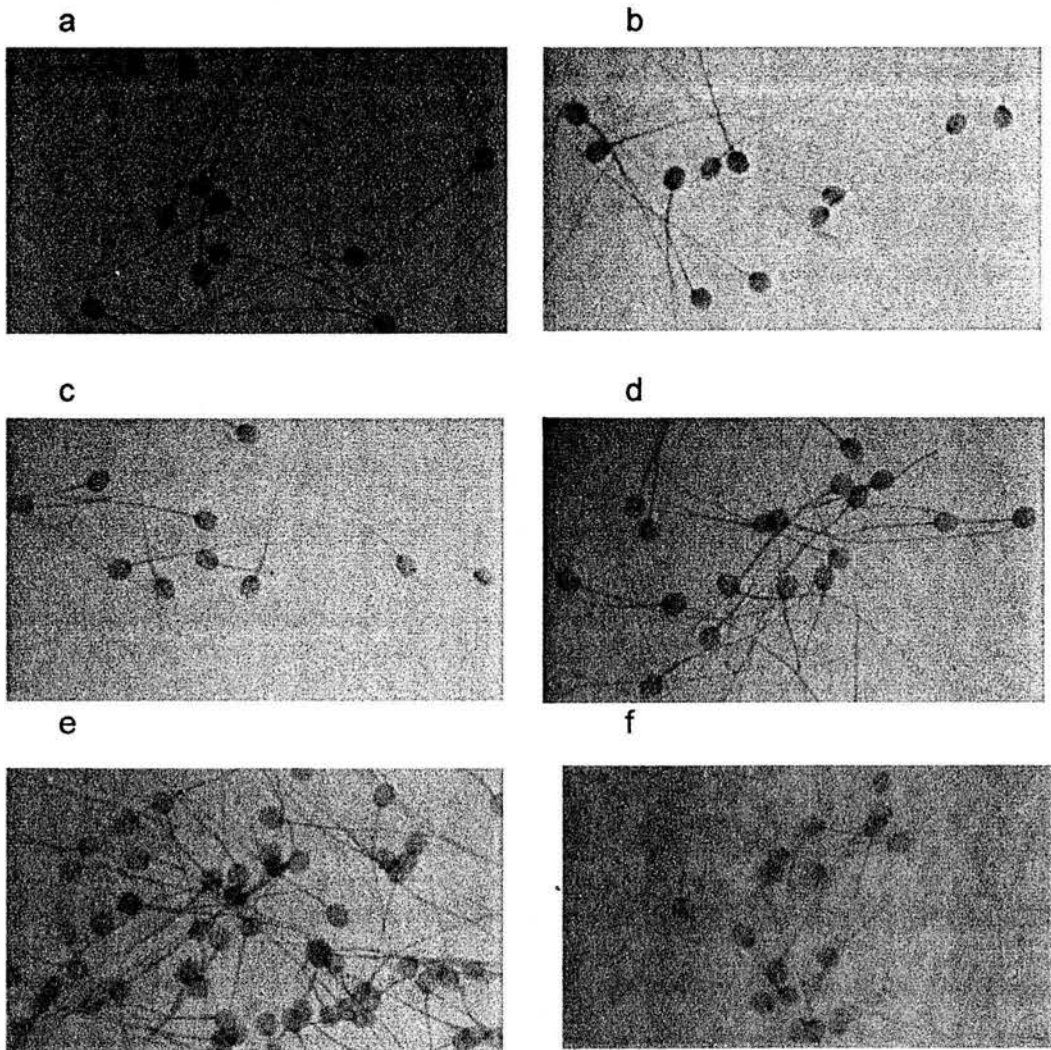


Figura 2. Microfotografías de espermatozoides maduros desmembrados, incubados en NaCl y tratados con DTT, heparina o DTT-heparina, teñidos con hematoxilina. Espermatozoides tratados sólo con DTT (1.5 mM) (a) y (b). Muestras fijadas a los 15 seg y a los tres min de tratamiento, respectivamente. Espermatozoides tratados sólo con heparina (5 USP) (c) y (d). Muestras fijadas a los 15 seg y a los 3 min de tratamiento, respectivamente. Espermatozoides tratados con DTT (1.5 mM) y heparina (5 USP). Muestras fijadas a los 15 seg y a los 3 min de tratamiento, respectivamente. Aumento total 1000 x.

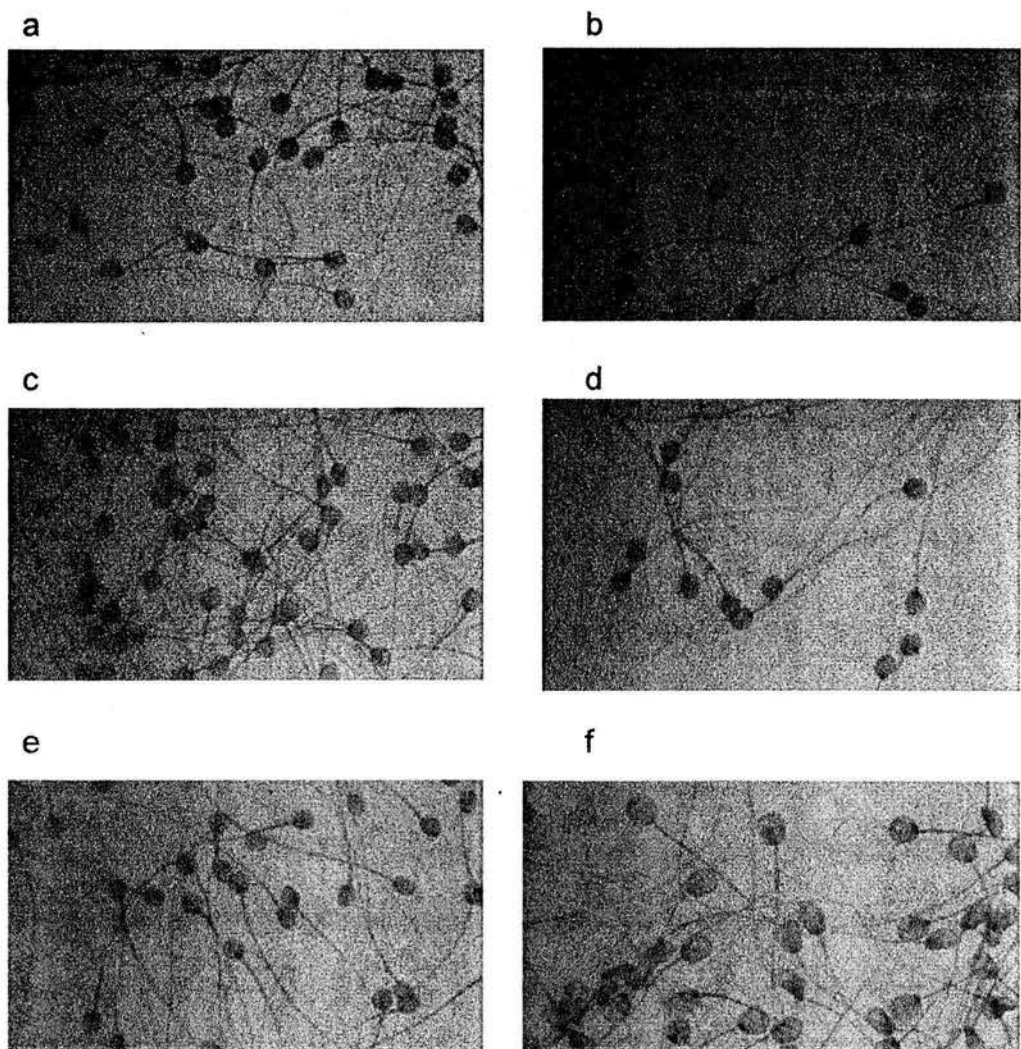


Figura 3. Microfotografías de espermatozoides con reacción acrosomal inducida, desmembranados e incubados en NaCl y tratados con DTT (1.5 mM), heparina (5 USP) o con DTT (1.5 mM)-heparina (5 USP) teñidos con hematoxilina. Espermatozoides tratados con DTT 1.5 mM (a) espermatozoides fijados a los 15 seg de tratamiento y (b) espermatozoides fijados a los 3 minutos de tratamiento. Espermatozoides incubados con heparina (5 USP). (c) y (d) Espermatozoides fijados a los 15 seg y a los 3 min de tratamiento respectivamente. Espermatozoides incubados con DTT (1.5 mM)-heparina (5 USP). (e) y (f) muestras fijadas a los 15 seg y a los 3 min de tratamiento, respectivamente. Aumento 1000 x.

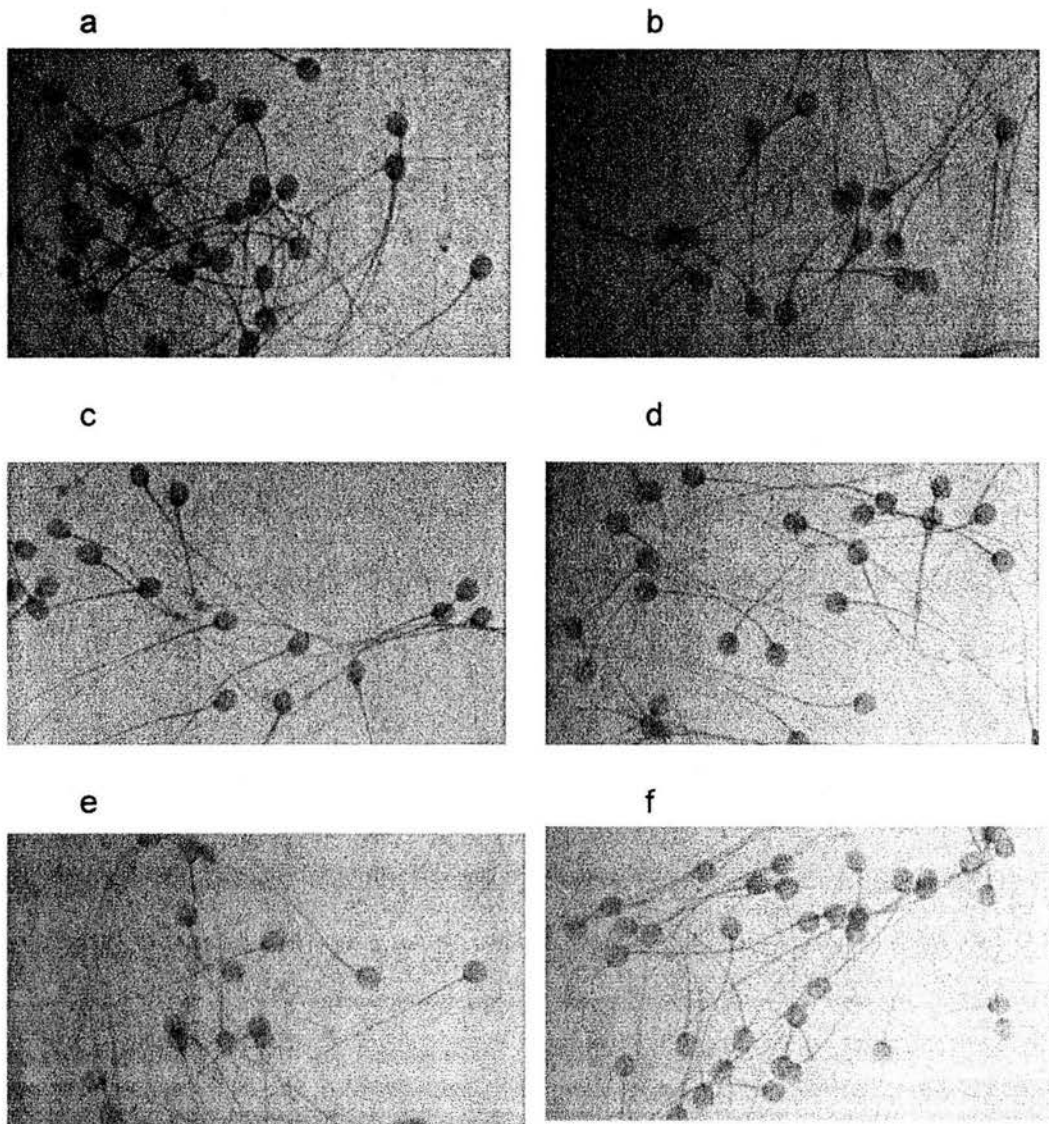


Figura 4. Microfotografías de espermatozoides maduros, desmembrados, incubados previamente en NaCl con faloidina, y posteriormente tratados con DTT, heparina y DTT-heparina y teñidos con hematoxilina. Espermatozoides tratados con DTT 1.5 mM (a) a los 15 seg de tratamiento y (b) a los 3 min de tratamiento. (c) y (d) Espermatozoides tratados con heparina 5 USP y fijados a los 15 seg y a los 3 min de tratamiento, respectivamente. (e) y (f) Espermatozoides tratados con DTT (1.5 mM)-heparina (5 USP) y fijados a los 15 seg y a los 3 min de tratamiento, respectivamente. Aumento total 1000 x.

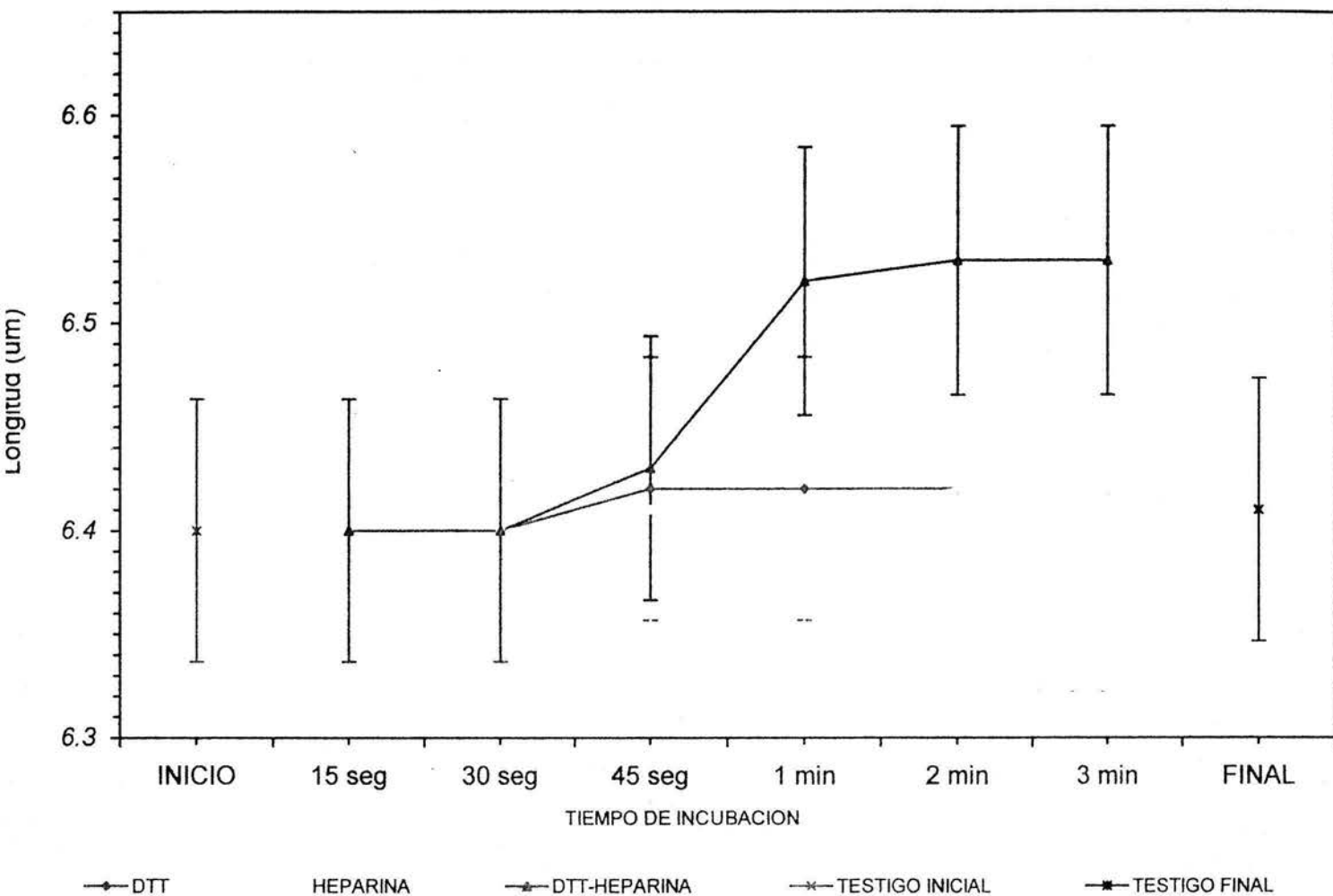


Figura 5. Longitud promedio de la región ecuatorial de los espermatozoides maduros, desmembrados y tratados con DTT (1.5 mM), heparina (5 USP) y tratamiento combinado.

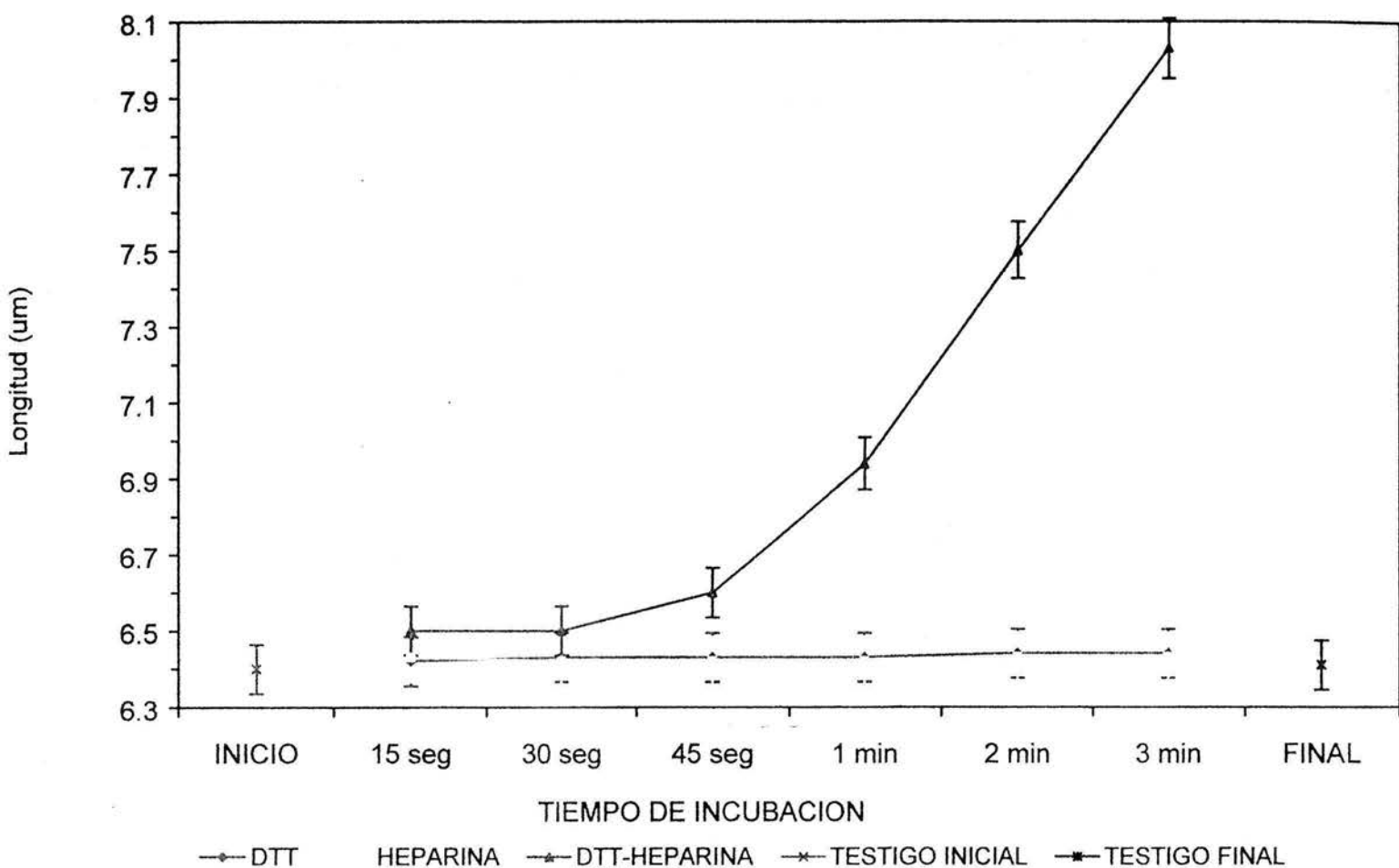


Figura 6. Longitud promedio de la region ecuatorial de los espermatozoides con reaccion acrosomal inducida, desmembrados y tratados con DTT (1.5 mM), heparina (5 USP) y DTT- heparina.

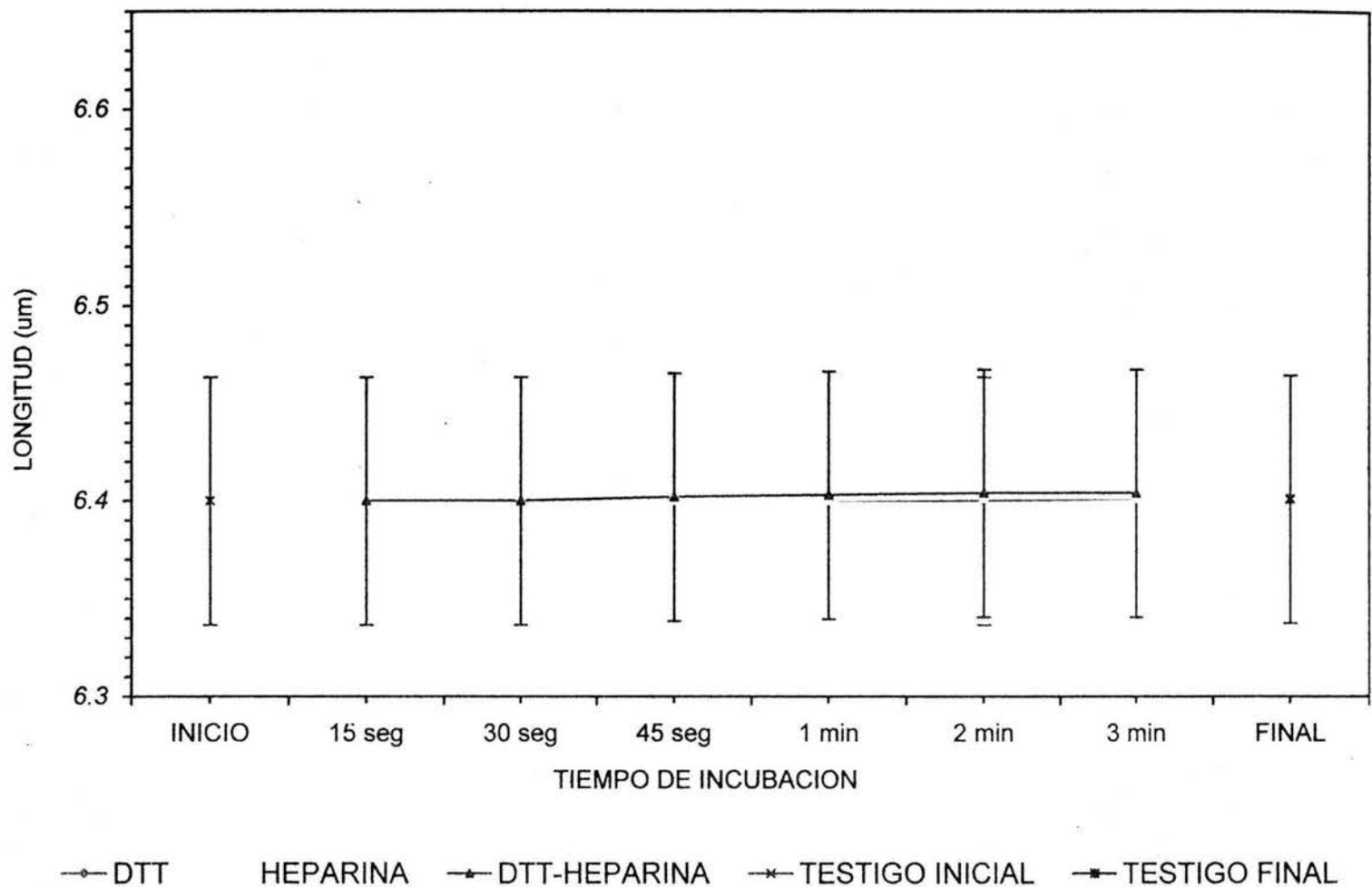


Figura 7. Longitud promedio de la region ecuatorial de los espermatozoides maduros desmembrados, incubados primero con faloidina y despues tratados con DTT(1.5 mM), heparina (5 USP) y DTT-heparina.

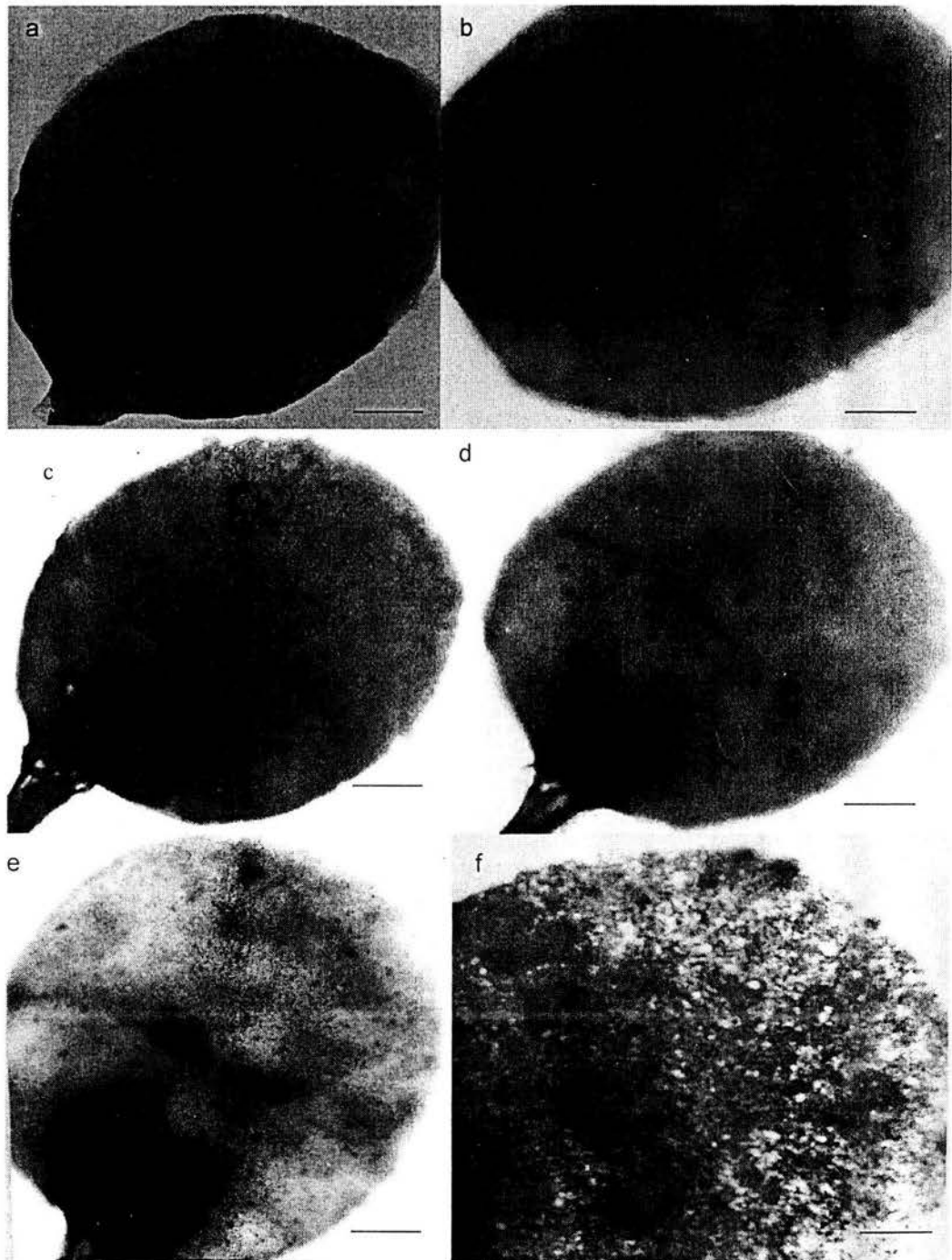


Figura 8. Microfotografías de las cabezas de espermatozoides maduros con la teca expuesta, tratados con DTT 1.5 mM y heparina 5 USP e incubados en NaCl a 37°C. (a) a los 15 seg de tratamiento, (b) a los 30 seg de tratamiento, (c) a los 45 seg de tratamiento, (d) al minuto de tratamiento, (e) a los 2 min de tratamiento y (f) a los 3 min de tratamiento. La barra equivale a 1 μ m.

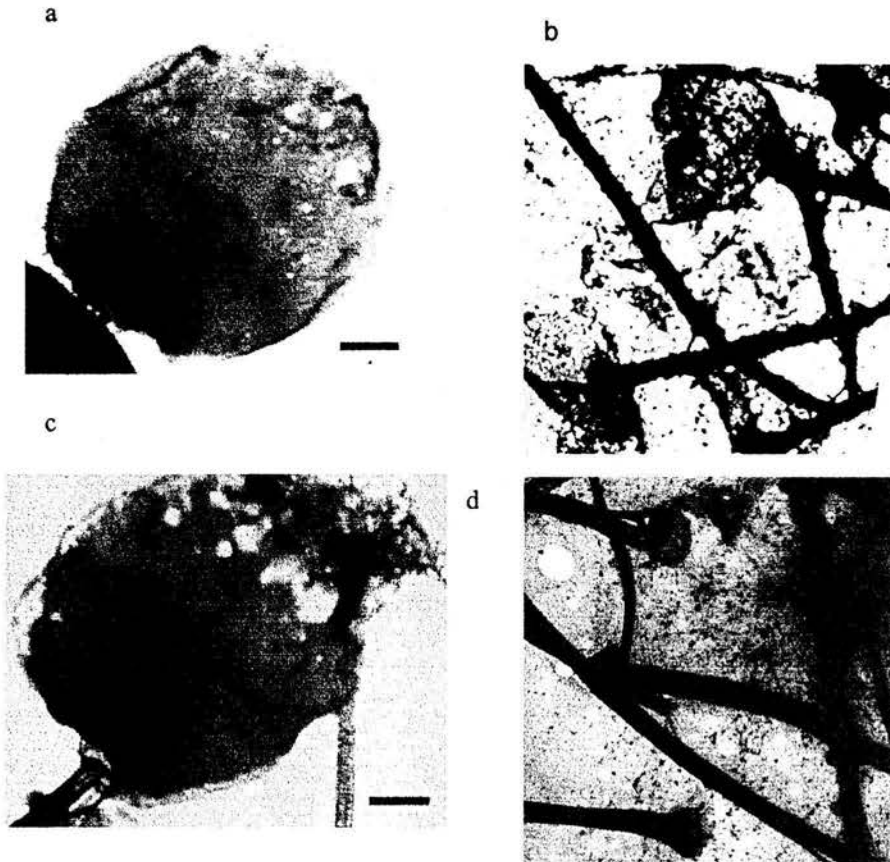


Figura 9. Microfotografías de espermatozoides con reacción acrosomal, desmembrados, incubados en NaCl a 37°C y tratados con DTT y heparina por tiempos preestablecidos. Muestras alícuotas fueron tomadas y fijadas para su observación al microscopio electrónico. (a) y (b) Espermatozoide tratado con DTT (5 mM)-heparina (5 USP) durante uno y 10 min respectivamente. (c) y (d) Espermatozoides tratados con DTT (1.5 mM)-heparina (5 USP) durante 10 y 30 min respectivamente. La barra equivale a 1 µm.

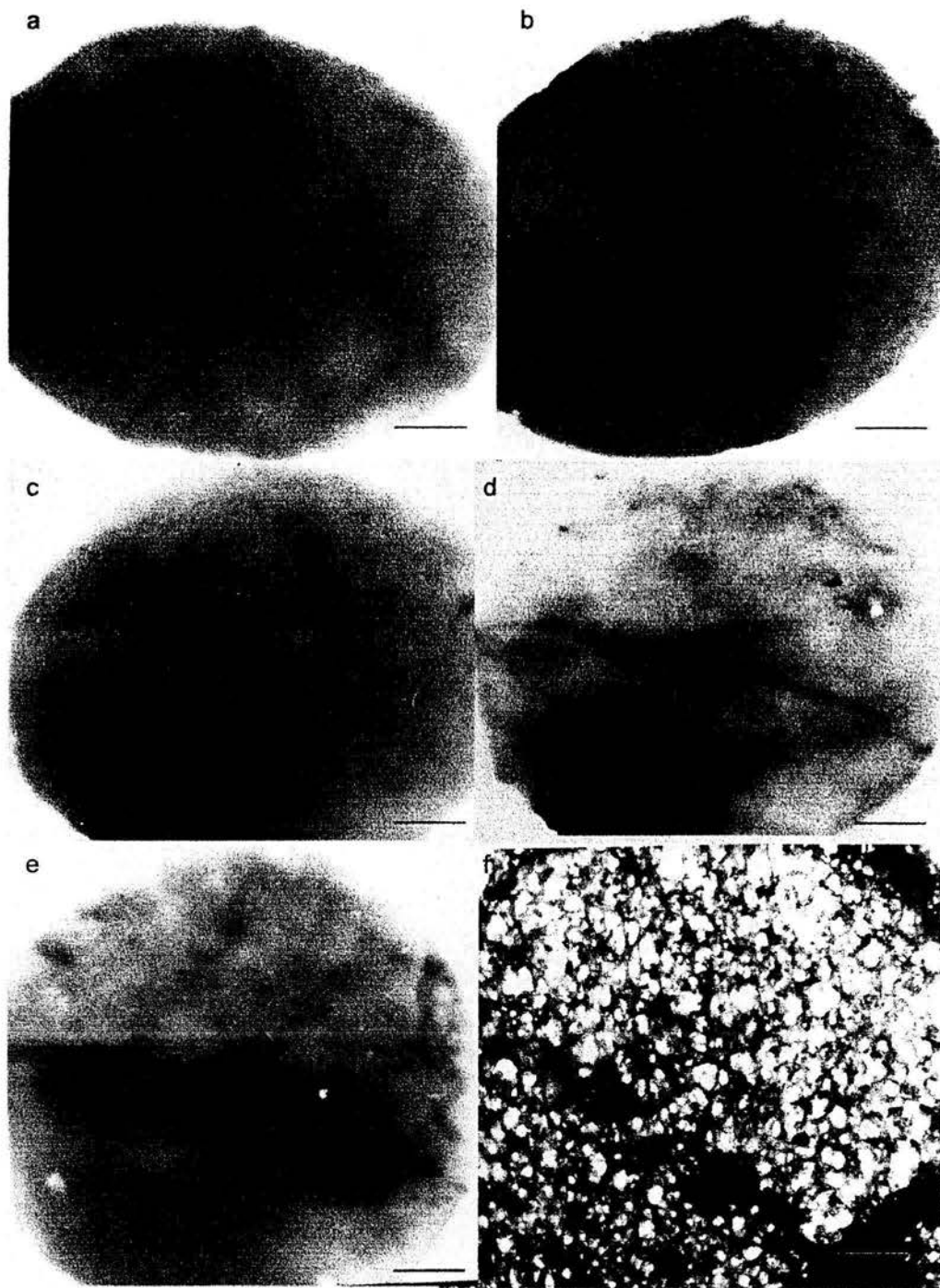


Figura 10. Microfotografías de las cabezas de espermatozoides con reacción acrosomal, incubados en NaCl y tratados con DTT 1.5 mM - heparina 5 USP: (a) a los 15 seg de tratamiento, (b) a los 30 seg de tratamiento, (c) a los 45 seg de tratamiento, (d) al minuto de tratamiento, (e) a los 2 min de tratamiento y (f) a los 3 min de tratamiento. La barra equivale a 1 μ m.

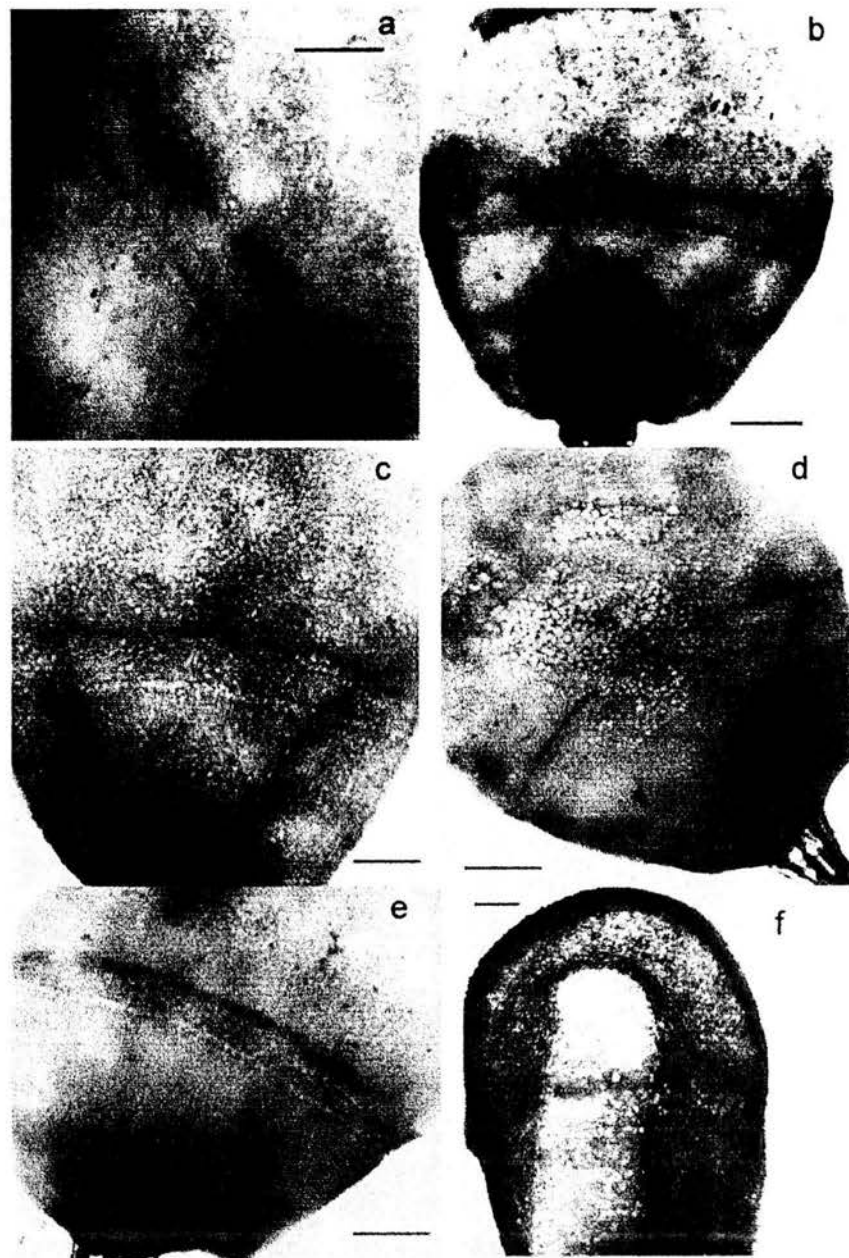


Figura 11. Fotomicrografías de los espermatozoides maduros, desmembrados, incubados inicialmente con faloidina y posteriormente tratados con DTT (1.5 mM)-heparina (5 USP). (a) a los 15 segundos de tratamiento, (b) a los 30 segundos de tratamiento, (c) a los 45 segundos de tratamiento, (d) 1 minuto de tratamiento, (e) a los 2 minutos de tratamiento y (f) a los 3 minutos de tratamiento. La barra equivale a 1 μm .

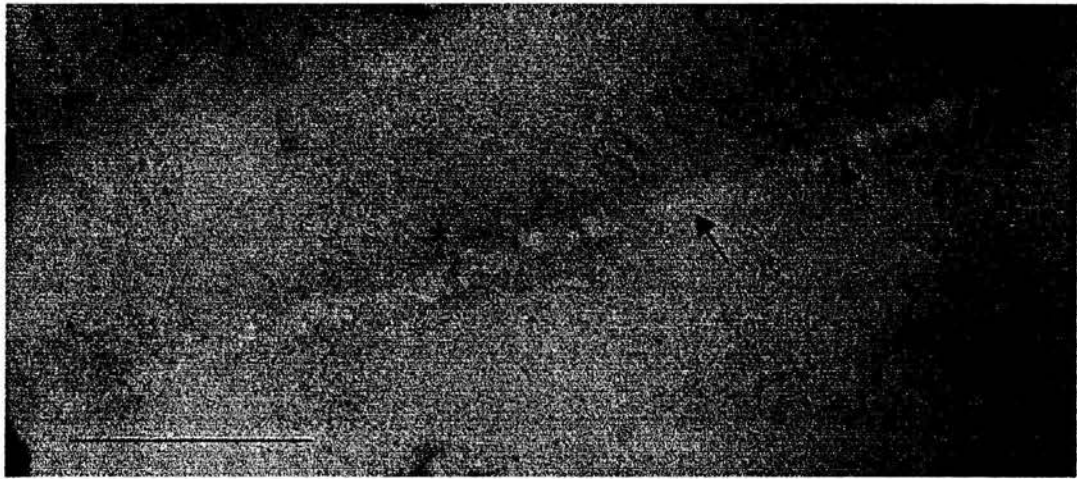


Figura 12. Microfotografía de la subestructura de la teca perinuclear de un espermatozoide maduro, desmembrado, incubado primero con faloidina y después tratado con DTT 1.5 mM – heparina 5 USP durante 3 min. Nótese las regiones electrolúcidas (flechas) y electrodensas de manera alternada y en cada punto electrodensa se encuentra insertada una pestaña (asterisco) de la subestructura. La barra equivale a 1 μ m

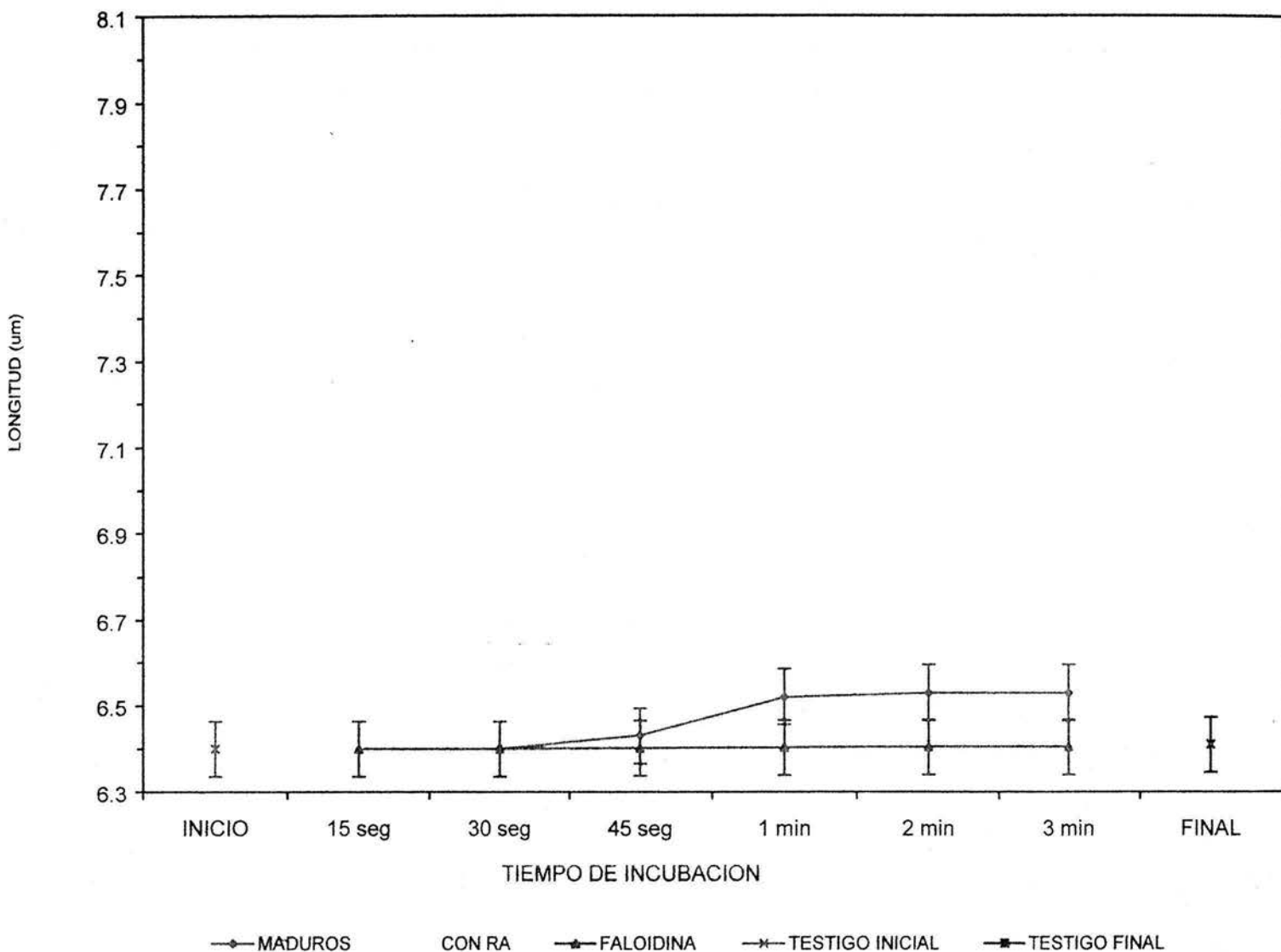


Figura 13. Comparación de los cambios producidos en la longitud de la región ecuatorial de los diferentes tipos de espermatozoides empleados todos tratados con DTT (1.5 mM) y con heparina (5 USP).