



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE  
LA SALUD ANIMAL**

**PARTICIPACIÓN DE ENZIMAS  
TRANSLOCASAS DURANTE LA REACCIÓN  
ACROSOMAL DEL ESPERMATOZOIDE DE  
CONEJO**

**T E S I S**  
PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA:  
**FÉLIX DE JESÚS MAYREN MENDOZA**

TUTOR:  
**DRA. ANA MARIA ROSALES TORRES**

COMITÉ TUTORAL:  
**DR. ALEJANDRO ÁVALOS RODRÍGUEZ**  
**DRA. MARÍA DE LOURDES JUÁREZ MOSQUEDA**

**México D. F.**

**2007**



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.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al más especial de todos, a ti señor, porque hiciste realidad este sueño, por todo el amor con el que me rodeas y por darme todo lo que tengo y no dejarme caer nunca.

Son muchas las personas especiales a las que me gustaría agradecer su amistad, apoyo, ánimo y compañía en las diferentes etapas de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en el corazón, sin importar en donde estén o si alguna vez llegan a leer estas dedicatorias quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**), por la beca otorgada.

### **Al Doctor Alejandro Ávalos Rodríguez**

Muy en especial agradezco tu amistad incondicional y la confianza que me brindaste en los momentos críticos, agradezco tu valioso apoyo en las técnicas de laboratorio y la asesoría en la elaboración de esta tesis, gracias por compartir tus conocimientos conmigo.

### **A la Doctora María de Lourdes Juárez Mosqueda**

Por su amistad y por brindarme su valiosa asesoría a lo largo de la tesis.

### **A la Doctora Ana María Rosales Torres**

Por ser un ejemplo a seguir, por su entusiasmo, dedicación y acertada dirección encaminada hacia la realización de esta tesis.

### **A la Doctora Marcela Vergara Onofre**

Por su amistad, bondad, entusiasmo y apoyo brindado.

### **A la Doctora Ivonne Heuze**

Jefa del bioterio de la UAM-X

Por la donación y mantenimiento de los conejos utilizados en este trabajo.

### **A la Doctora María Elena Trujillo Ortega**

Por brindarme un momento de su valioso tiempo, para revisar esta tesis.

### **Al Doctor Héctor Jiménez Severiano**

Por brindarme un momento de su valioso tiempo, para revisar esta tesis.

A todos mis amigos, sin excluir a ninguno, pero en especial a: **Alejandro, Ángel, Clara, Marcela, Adrián, Verónica, Andrés, Alicia, Carolina, Beatriz, Israel, Vanesa, Adriana**,...mil gracias por todos los momentos que hemos pasado juntos y por permitirme conocerlos y ser parte de su vida, gracias por aconsejarme, regañarme y compartir risas y llantos en todo momento.

A todos mis profesores, no solo de la carrera, sino de toda la vida, mil gracias, porque de alguna manera forman parte de lo que ahora soy.

A todos mi fraternal agradecimiento.

## DEDICATORIAS

A mí querido padre el Sr. **Leonides Félix Mayren Paulin**

Que ha sido siempre un hombre admirable y respetuoso, que me ha brindado cuidados, amor y comprensión, quien con sus sabios consejos ha orientado mis pasos por el camino recto de la vida, convirtiéndose por sus virtudes en el mejor de mis amigos. Acertada y rica herencia es su ejemplo, con el tiempo quizá pueda imitarlo, tal vez pueda igualarlo, pero jamás superarlo. Por eso mi padre merece hoy mañana y siempre todos mis honores, mi cariño y el respeto de sus hijos, gracias por ser mi papá y por creer en mí.

A mi madre Sra. **Sixta Juana Mendoza Ramírez**

Mamá, no me equivoco si digo que eres la mejor mamá del mundo, gracias por todo tu amor, esfuerzo, apoyo y por la confianza que depositaste en mí, recibe esta modesta dedicación como un homenaje a tu grandeza, que de niño me dieras tu amor y tus cuidados y de hombre fortaleza. Hago votos para que hoy de dicha mis logros te colmen y mañana te llenen de orgullo, ten presente que la gloria más grande que tengo es el ser hijo tuyo.

A mis hermanos:

**Oscar, María Guadalupe, Juan Carlos, Omar, Araceli Yesenia, Hugo David y a la pequeña Rosa Elena**, quienes con su apoyo moral y el sacrificio de sus sueños me ayudaron a no abandonar la batalla contra la adversidad, los amaré siempre.

A mis cuñadas:

**Sofía y Lucía**, gracias por su amistad y apoyo.

A mí adorada esposa: **Miriam Marcela Carrillo Ramírez**

Por creer en mí, por todo su amor, paciencia y apoyo incondicional en todo momento, te amo flaquita.

A mi hijo: **Ángel de Jesús (chuchín)**

Por ser el motor que impulsa mi vida y me motiva a seguir siempre adelante, por ser mi fuerza y mi inspiración, te amo hijo.

## APRENDÍ Y DECIDÍ

Y así un día después de esperar tanto, un día como cualquier otro, decidí triunfar, decidí no esperar a las oportunidades, sino yo mismo buscarlas, decidí ver cada problema como la oportunidad de encontrar una solución, decidí ver cada día como una nueva oportunidad de ser feliz.

Aquel día descubrí que mi único rival eran mis propias debilidades, y que en éstas, está la única y mejor forma de superarnos. Aquel día dejé de temer a perder y empecé a temer a no ganar.

Descubrí que no era yo el mejor y que quizás nunca lo fui, me dejó de importar quien ganara o quien perdiera, ahora me importa simplemente saberme mejor que ayer. Aprendí que lo difícil no es llegar a la cima, sino jamás dejar de subir.

Aprendí que el mejor triunfo que puedo tener, es tener el derecho de llamar a alguien "amigo", descubrí que el amor es más que un simple estado de enamoramiento, "el amor es una filosofía de vida".

Aquel día dejé de ser un reflejo de mis escasos triunfos pasados y empecé a ser mi propia tenue luz de este presente, aprendí que de nada sirve ser luz, sino vas a iluminar el camino de los demás. Aquel día decidí cambiar tantas cosas... Aquel día aprendí que los sueños son solamente para hacerse realidad y desde aquel día ya no duermo para descansar, ahora simplemente duermo para soñar.

<b>Índice</b>	<b>página</b>
<b>I.- Resumen</b> -----	VII
<b>II.- Abstract</b> -----	VIII
<b>II.- Introducción</b> -----	01
<b>IV.- Antecedentes</b> -----	03
1.- Espermatogénesis-----	03
1.1.- Maduración espermática-----	04
1.2.- Morfología del espermatozoide maduro-----	05
1.3.- Metabolismo de las células espermáticas-----	08
2.- Composición y organización lipídica de la membrana	
Plasmática-----	08
2.1-Asimetría de la membrana plasmática	
de la célula espermática -----	10
2.2.- Fosfatidilserina-----	13
2.3.- Flipasas-----	14
2.4.- Flopasas-----	15
2.5.- Escramblasas-----	16
3.- Capacitación espermática-----	17
4.- Reacción acrosomal-----	22
4.1- Canales iónicos-----	23
4.2- Transporte de iones-----	24
4.3- Fosforilación de proteínas-----	25
4.4- Proteínas G-----	25
4.5.- Progesterona (P <sub>4</sub> ) -----	26
4.6.- Participación del calcio durante la	
reacción acrosomal-----	28
4.7- Participación de elementos del citoesqueleto	
durante la capacitación y la reacción acrosomal-----	30
4.8.- Interacción del espermatozoide con el ovocito-----	32

<b>V.- Planteamiento del problema</b> -----	33
<b>VI.- Hipótesis</b> -----	35
<b>VII.- Objetivo general</b> -----	35
<b>VIII.- Objetivos particulares</b> -----	35
<b>IX.- Material y métodos</b> -----	36
Obtención de muestras-----	36
Procesamiento de las muestras-----	36
Inducción de la capacitación espermática-----	37
Evaluación de la capacitación mediante clorhidrato de tetraciclina (CTC)-----	37
Inducción de la reacción acrosomal-----	38
Evaluación de la reacción acrosomal por el método de Azul Brillante de Coomassie (CBB)-----	39
Presencia de fosfatidilserina en los espermatozoides-----	39
Análisis estadístico-----	41
<b>X.- Resultados</b> -----	42
<b>XI.- Discusión</b> -----	48
<b>XII.- Conclusiones</b> -----	53
<b>XIII.- Literatura citada</b> -----	54

**Palabras clave:** Capacitación, reacción acrosomal, asimetría fosfolipídica, fosfatidilserina, enzimas translocasas, NEM.

## **I.- Resumen**

Esta investigación se realizó con la finalidad de evaluar la participación de enzimas translocadoras de fosfolípidos en el proceso de reacción acrosomal (RA), en espermatozoides de conejo obtenidos de la región caudal del epidídimo, utilizando la progesterona ( $P_4$ ) como inductor de RA y N-Etilmaleimida (NEM) como inhibidor de translocasas. Se evaluó la capacitación espermática a las 6 horas de incubación, mediante la tinción fluorescente con clorotetraciclina, la cual fue de un  $70 \pm 5 \%$ . La RA se evaluó mediante la tinción con Azul brillante de Coomassie (CBB). Los resultados obtenidos muestran un incremento significativo ( $P > 0.05$ ) en el porcentaje de RA en todos los tratamientos realizados. En el grupo testigo y el tratado con NEM se observaron los porcentajes más bajos de RA para todos los tiempos de estudio y no mostraron diferencias significativas entre ambos grupos. Los resultados de esta investigación, muestran claramente el efecto inductor de RA que tiene la  $P_4$ . En el grupo tratado con  $P_4$  y NEM, se observó que NEM tuvo un efecto inhibitorio muy claro en la RA inducida por  $P_4$  ya que en todos los casos a partir de los 15 minutos de iniciar el tratamiento, el grupo en el que se combinó la  $P_4$  con NEM mostraron cifras más bajas estadísticamente significativas ( $P > 0.05$ ) de espermatozoides reaccionados que cuando se trataron sólo con  $P_4$ . Estos resultados muestran la posible participación de enzimas translocasas en la RA.

**Palabras clave:** Capacitación, reacción acrosomal, asimetría fosfolipídica, fosfatidilserina, enzimas translocasas, NEM

## **II. - Abstract**

### **Participation of translocase enzymes in the acrosomal reaction of rabbit spermatozoa**

This research was conducted to evaluate the participation of the phospholipid translocating enzymes in the acrosomal reaction (AR) in rabbit sperm cells, obtained from the rabbit cauda epididymal, using progesterone ( $P_4$ ) as AR inducer and N-Ethyl-maleymide (NEM) as translocase inhibitor. The spermatocapacitation was evaluated at 6 hour of incubation, using the chlortetracycline fluorescent dyeing;  $70 \pm 5\%$  of sperm cells were found to be capacitated. The AR was evaluated using Coomassie blue brilliant (CBB); the results showed a significant increase in the percentage of AR with all treatments carried out. In the control and NEM-treated groups the lower percentage of AR for all times of study was observed, not showing significant differences between both groups. The results of this research clearly show the inducing effect of  $P_4$  on AR. In the group treated with  $P_4$  and NEM, it was observed that NEM has an inhibitor effect on the AR induced by  $P_4$ , as in all cases, after 15 minutes of treatment, the group where  $P_4$  and NEM were combined showed a statistically significant ( $P > 0.05$ ) lower number of reacted spermatozoas than the group treated with  $P_4$  alone. This results show the possible participation of translocase enzymes in the AR.

**(Key words:** Capacitation, acrosomal reaction, phospholipidic asymmetry, phosphatidylserine, translocases enzyme, NEM)

## II.- INTRODUCCIÓN

En los mamíferos, los espermatozoides eyaculados son activados en el tracto reproductor femenino, mediante un proceso denominado capacitación. Durante este proceso se produce una reorganización de la membrana plasmática (MP) (*Frits et al., 2000*) de tal forma que sólo aquellos que sean exitosamente capacitados podrán unirse a la zona pelúcida (ZP) del ovocito de manera especie específica, desencadenando la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  al espermatozoide y la fusión de la MP con la membrana acrosomal externa en múltiples sitios, proceso que se conoce como reacción acrosomal (RA) (*Yanagimachi, 1994*). De esta forma, la composición y organización de la MP regulan de manera específica los eventos que conducirán el destino de los espermatozoides, entre ellos: la afinidad para factores de adhesión, la señalización celular y eventos de fusión (*Dunina-Barkovskaya, 1998*).

Es importante mencionar que una de las principales características de la MP de la mayoría de las células, incluyendo al espermatozoide, es que sus componentes estructurales, principalmente fosfolípidos, se encuentran asimétricamente distribuidos. Diversos métodos han revelado que los fosfolípidos como esfingomielina (SM) y fosfatidilcolina (PC) se encuentran principalmente en la cara externa de la MP (*Gadella y Harrison., 2000*). Los aminofosfolípidos como fosfatidiletanolamina (PE) y especialmente fosfatidilserina (PS) están localizados en la cara interna de la MP, es importante resaltar que por el hecho de que el 100 % de PS se encuentre en la cara interna, la presencia de ésta en la cara externa, es considerado como indicador de la pérdida de la asimetría membranaral (*Kuypers et al., 1996*).

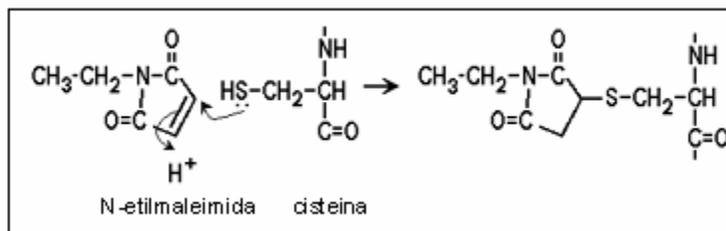
En la mayoría de los tipos celulares la pérdida de la asimetría de la membrana en condiciones patológicas es una señal para que las células se suiciden, por lo que la exposición de PS en la capa externa es un indicador de apoptosis, ya que favorece la fagocitosis de estas células por macrófagos (*Gadella y Harrison., 2000*). Sin embargo, en las plaquetas la exposición de la PS en la cara externa de la MP, se requiere para la activación de las mismas, aquí la PS permite la

activación de protrombina a trombina directamente (*Bevers et al., 1996; Lentz., 2003*), mientras que en el espermatozoide favorece la fusión de la MP y la membrana acrosomal externa, durante la RA. Es decir durante los procesos de capacitación y RA, ocurre translocación de fosfolípidos en la MP del espermatozoide, de tal forma que pierde su asimetría.

La asimetría de las membranas biológicas está regulada por enzimas denominadas translocasas; flipasas, que transportan fosfolípidos de la cara externa hacia la cara interna y flopasas, que actúan de manera inversa a las flipasas, dando lugar ambas enzimas al movimiento de flip-flop de los fosfolípidos (*Gadella y Harrison., 2000*).

Estudios con huevos de erizo de mar han permitido evaluar sustancias agonistas y antagonistas de las enzimas translocasas de la MP, estableciendo que la PC-NBD una translocasa sintética, facilita la translocación fosfolipídica (*Boon y Smith., 2001*) y que sustancias como el N-Etilmaleimida (NEM) inhibe la translocación de aminofosfolípidos, impidiendo la formación de vesículas en la membrana celular.

El N-Etilmaleimida (1-Etil-1H- pirrol-2-5-dion  $C_6H_7NO_2$ ), es un compuesto que bloquea los grupos sulfhidrilos (SH), de tal manera que las proteínas que tengan estos grupos expuestos disminuirán su actividad (**figura 1**) (*Riordan y Vallee., 1972, Kuypers et al., 1996*) ya que este agente alquilante inhibe de manera irreversible la actividad de las ATPasas (*Michaut et al., 2000, Pastore et al., 2000, Boon y Smith., 2001*).



**Figura 1** Inhibición del grupo sulfhidrido de una proteína por el N-Etilmaleimida, en este ejemplo, los grupos sulfhidrilos expuestos corresponden al aminoácido cisteína.

## **IV.- ANTECEDENTES**

### **Espermatogénesis**

La espermatogénesis es el mecanismo encargado de la producción de espermatozoides. Estos se forman a partir de unas células denominadas espermatogonias, que se localizan en los túbulos seminíferos de los testículos ([Hafez y Hafez., 2002](#)).

### **Espermatocitogénesis**

Es la fase proliferativa de la espermatogénesis donde las células germinales se multiplican por una serie de divisiones celulares. Comienza con la migración del espermatogonio desde la membrana basal hacia el lumen del túbulo seminífero. El espermatogonio es activado para formar el espermatogonio activo tipo A. Gran parte de los espermatogonios tipo "A" se dividen mitóticamente para formar espermatogonio tipo I y algunos de los tipo "A" se retienen como espermatogonio tipo "A" latentes. De esta manera las células tipo "A" proveen células hijas para la formación de espermatozoides pero no disminuyen en número durante el proceso ([Vendrel, 2003](#)).

Los espermatogonios tipo intermedio, se dividen para formar espermatogonios tipo "B" que procede a la última fase de la división mitótica para formar espermatocitos primarios. El espermatogonio tipo "A" contiene dos o más nucleolos mientras que el espermatogonio tipo "B" contiene un sólo nucleolo ([Hafez y Hafez., 2002](#)).

Los espermatogonios tipo B pasan por una serie de divisiones para formar 16 espermatocitos primarios de cada espermatogonio. El número diploide de cromosomas no ha cambiado todavía. Cada espermatocito primario se divide para formar dos espermatocitos secundarios cambiando el número de cromosomas a haploides. Luego los espermatocitos secundarios forman dos espermátides cada uno. Este último proceso toma aproximadamente 1 ó 2 días, por lo que difícilmente es posible observar espermatocitos secundarios debido a su corta vida ([Vendrel, 2003](#)).

## **Espermiogénesis**

Es la fase de diferenciación de la espermatogénesis, es donde el núcleo y el citoplasma de la célula pasan por cambios morfológicos para formar el espermatozoide. La espermatida es una célula redonda con los organelos normales como los de una célula somática. Cada uno de estos organelos está destinado a cambiar para formar una unidad funcional del espermatozoide, los principales cambios son los siguientes:

- 1 - La membrana celular se retiene como la cobertura externa del espermatozoide.
- 2- El citoplasma emigra gradualmente a lo largo del núcleo hacia la región caudal del flagelo, donde se pierde dejando sólo pequeños remanentes del citoplasma original.
- 3- El núcleo se alarga y se achata pero se mantiene relativamente constante en tamaño y forma, siendo el mayor componente de la cabeza del espermatozoide.
- 4 - La mayor parte de la diferencia ocurre con los organelos. El aparato de Golgi forma a través de una serie de eventos el acrosoma de la cabeza. Las mitocondrias forman un elemento espiral alrededor del filamento axial para formar la pieza media del espermatozoide.

La espermiogénesis comienza en los túbulos seminíferos y se completa en el epidídimo ([Egozcue et al., 2002](#)).

### **Maduración espermática**

Los espermatozoides procedentes de los tubos seminíferos, son transportados a través de un conducto altamente contorneado llamado epidídimo. El epidídimo se divide macroscópicamente en tres regiones principales: cabeza (porción inicial), cuerpo (porción media) y cauda (porción terminal). Los primeros dos segmentos están relacionados con la maduración espermática, mientras que el terminal sirve para el almacenamiento de espermatozoides, el cual puede contener hasta el 70%

del número total de espermatozoides ([Sutovsky et al., 2001](#)).

Durante su transporte a través del epidídimo los espermatozoides desarrollan la habilidad para fecundar al óvulo, proceso conocido como maduración epididimaria. La falta de fertilidad en los espermatozoides de la cabeza del epidídimo puede relacionarse con el tipo de motilidad en estos espermatozoides inmaduros, éstos poseen un movimiento circular activo, pero aún son incapaces de un movimiento progresivo vigoroso característico de los espermatozoides maduros ([Jones., 2004](#)).

El desarrollo de la capacidad para fecundar se asocia con cambios de varios aspectos de integridad funcional del espermatozoide: a) desarrollo del potencial para sostener la motilidad progresiva, b) alteración en los patrones metabólicos y estados estructurales de los organelos específicos del flagelo, c) cambios en la naturaleza de la superficie de la MP y d) modificación, por lo menos en algunas especies de la forma del acrosoma ([Robitaille et al., 1991](#)). Durante el tránsito epididimal, la gota citoplásmica migra de la región de la cabeza hacia la parte caudal del espermatozoide, por lo general la migración se inicia en el momento en el que el espermatozoide pasa de la cabeza a la cola del epidídimo ([Nolan y Hammerstedt., 1997](#), [Jones., 2004](#)). La presencia de gota citoplásmica en un gran número de espermatozoides eyaculados es signo de inmadurez, ya que en la mayoría de las especies con excepción del verraco ([Michel et al., 2002](#)) la gota se separa del espermatozoide antes de que ocurra la eyaculación ([Vega et al., 2002](#)).

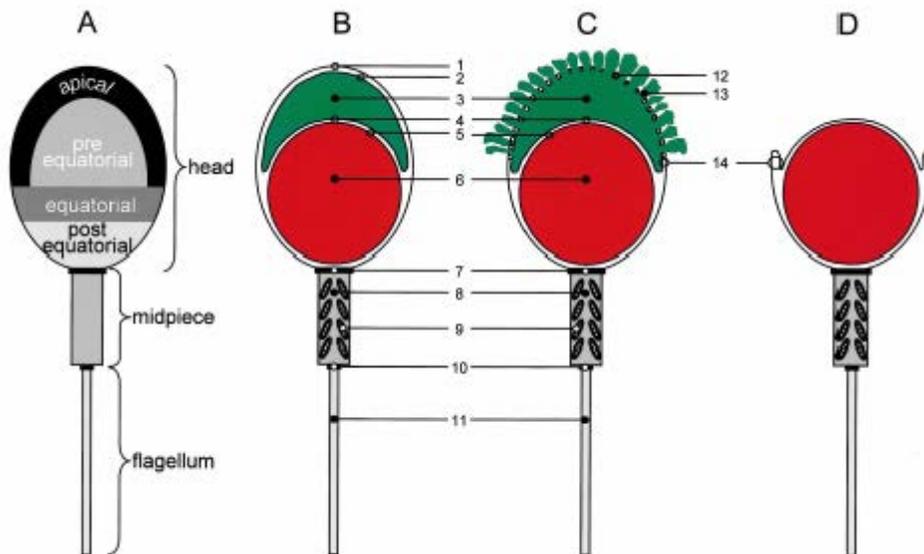
### **Morfología del espermatozoide maduro**

La MP del espermatozoide se caracteriza por estar subdividida en regiones bien delineadas denominadas dominios, los cuales difieren en cuanto a la concentración y distribución de los distintos componentes de la MP (fosfolípidos, proteínas, colesterol, carbohidratos, etc.) ([Frits et al., 2000](#), [Alberts et al., 2002](#), [Ainsworth., 2005](#)). Dentro de los dominios más estudiados están la región acrosomal, la cual difiere principalmente de los demás dominios precisamente por que es en este lugar donde se encuentran más receptores a P<sub>4</sub>; otro dominio

importante es la región post-acrosomal, lugar donde hay depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$ , dando una coloración diferencial entre espermatozoides capacitados y no capacitados cuando se realiza la tinción con clorhidrato de tetraciclina (CTC) (Rathi et al., 2003) y; otros dos dominios estudiados son el ecuatorial y el de la pieza media.

Morfológicamente los espermatozoides maduros han sido divididos en tres regiones altamente especializadas: a) la cabeza, representa la parte más voluminosa y anterior de la célula espermática y está directamente involucrada en todos los mecanismos de interacción, entre espermatozoide y ovocito, que darán inicio a la formación de un nuevo individuo. La cabeza del espermatozoide contiene poca cantidad de citoplasma y en ella se encuentran el núcleo y el acrosoma. El acrosoma es una vesícula compleja que contiene enzimas hidrolíticas, necesarias para la penetración de la zona pelúcida (ZP) del ovocito (figura 2) (Yanagimachi et al., 1994, Frits et al., 2000). Este organelo deriva del aparato de Golgi durante la espermiogénesis y debido al origen, estructura y función ha sido comparado con un lisosoma o con un gránulo secretor (Reyes y Chavarría., 1987). A semejanza con este último, el acrosoma presenta un evento de exocitosis regulada, esto a través de la interacción coordinada de compuestos de origen intra y extracelular, por ejemplo: fosfoinosítidos, nucleótidos cíclicos, aniones y cationes, calmodulina, progesterona ( $\text{P}_4$ ), glicosaminoglicanos, factores de crecimiento, microtúbulos y microfilamentos (Meizel., 1985, De Jonge et al., 1993, Fabbri et al., 1998); b) La siguiente región es la pieza media, en la cual se localizan las mitocondrias, encargadas de la producción de energía y la tercera región; c) El flagelo o cola, que le da la movilidad a la célula (Frits et al., 2000). La región de la cola comprendida entre el cuello y el anillo citoplásmico es la pieza media. El centro de este segmento, junto con toda la longitud de la cola, es recorrido por el axonema. El axonema como tal se compone de nueve pares de microtúbulos dispuestos radialmente alrededor de dos pares de microtúbulos. En el segmento medio esta disposición 9+2 de los microtúbulos está rodeado por nueve fibras gruesas que al parecer están relacionadas con los nueve dobletes del axonema. El axonema y las fibras densas asociadas del segmento medio están cubiertos de manera periférica por numerosas mitocondrias. La vaina mitocondrial

dispuesta en un patrón helicoidal alrededor de las fibras gruesas de la cola es la fuente de energía necesaria para la movilidad espermática. El segmento principal es la siguiente región del flagelo que se continúa en sentido posterior, desde el anillo citoplásmico hasta casi la punta de la cola, este está formado por el axonema en el centro, las fibras gruesas asociadas, y la vaina fibrosa; esta última da estabilidad a los elementos contráctiles de la cola ([Reyes y Chavarría., 1987](#)). La última porción del flagelo es la pieza que se continúa posterior a la terminación de la vaina fibrosa, esta contiene solo el axonema central cubierto por la MP. El axonema es la estructura que le proporciona movilidad al espermatozoide; los pares externos de microtúbulos del patrón 9+2 generan las ondas de flexión de la cola por un movimiento deslizante entre pares adyacentes ([Frits et al., 2000](#)).



**Figura 2** Las células espermáticas son células polarizadas con una cabeza, una pieza media y un flagelo (A, esquema de un espermatozoide). La cabeza del espermatozoide puede ser subdividida en cuatro regiones: apical, pre-ecuatorial, ecuatorial y post-ecuatorial. El acrosoma (vesícula secretoria, 3) está situada en la región apical del núcleo (B). Después de la unión de la célula espermática con el ovocito, la membrana plasmática del espermatozoide se fusiona en múltiples sitios con la membrana acrosomal externa (C). El contenido acrosomal (enzimas hidrolíticas) es secretado, el cual le permite a la célula espermática digerir la matriz extracelular del ovocito (ZP). Después de que se ha realizado la reacción acrosomal la membrana acrosomal interna forma una continuación con los remanentes de la membrana plasmática (D). Esta orquilla está involucrada en la unión primaria de la célula espermática con el oolema (14). 1: membrana plasmática; 2: membrana acrosomal externa; 3: contenido acrosomal; 4: membrana acrosomal interna; 5: envoltura nuclear; 6: núcleo; 7: anillo posterior; 8: pieza media; 9: mitocondrias; 10: anillo

anular; 11: flagelo; 12: vesícula combinada (MP fusionada con la membrana acrosomal externa); 13: secreción acrosomal.

### **Metabolismo de las células espermáticas**

Aunque los espermatozoides carecen de muchos de los organelos que participan en los procesos metabólicos, son metabólicamente activos debido a que poseen las enzimas necesarias para realizar las reacciones bioquímicas de la glucólisis, el ciclo de Krebs, la oxidación de los ácidos grasos y el transporte de electrones. En condiciones anaeróbicas, los espermatozoides degradan glucosa, fructosa o manosa a ácido láctico; como la fructosa es el azúcar más abundante en el semen, es la actividad fructolítica la que le permite a los espermatozoides sobrevivir en condiciones anaeróbicas. Esta característica es importante durante el almacenamiento de espermatozoides para su uso en la inseminación artificial ([Yanagimachi et al., 1994](#)).

Los espermatozoides utilizan una variedad de sustratos en presencia de oxígeno, esta actividad respiratoria es la que les permite emplear el lactato o el piruvato, resultantes de la degradación de la fructosa, para la producción de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y agua (H<sub>2</sub>O). La vía oxidativa, que se localiza en las mitocondrias, es mucho más eficiente que la fructólisis para producir energía. Gran parte del ATP que se genera se emplea para la movilidad y otra parte se destina a mantener la integridad de los procesos de transporte activo de las membranas del espermatozoide. Estos procesos de transporte activo impiden la pérdida de componentes iónicos vitales de la célula espermática. En ausencia de sustratos exógenos, los espermatozoides utilizan sus reservas intracelulares como fuente de energía a corto plazo. Por medio de sustratos marcados radiactivamente se sabe que durante la capacitación *in vitro*, la glucosa se utiliza preferentemente por la vía glicolítica, aunque existe también un consumo alternativo a través de la vía de las pentosas ([Hicks et al., 1972](#)).

## **Composición y organización lipídica de la membrana plasmática**

La composición lipídica de la MP de muchas especies de mamíferos ha sido descrita, aunque hay una considerable variación entre ellas, en general la MP contiene aproximadamente un 70% de fosfolípidos, 25% de lípidos neutros y 5% de glicolípidos en base molar. Los fosfolípidos pueden ser divididos en fosfoglicerolípidos y esfingomiélin (SM). La composición fosfolipídica de las células espermáticas es generalmente comparable con la de las células somáticas. Por ejemplo, las células espermáticas humanas contienen un 50% de fosfatidilcolina (PC), 30% de fosfatidiletanolamina (PE), 12.5% de (SM), 3% de fosfatidilserina (PS), 2.5% de cardiolipina (CL) y cerca del 2% de fosfatidilinositol (PI). Durante la capacitación los niveles de PC pueden incrementarse, debido a la metilación de PE ([Mann y Lutwak-Mann., 1981](#), [Frits et al., 2000](#)).

Sin embargo variaciones en la composición de lípidos neutros de las membranas espermáticas pueden ser encontradas no solo entre las especies sino entre los eyaculados de un mismo individuo; por ejemplo, el factor más variable es el contenido de colesterol, el espermatozoide humano contiene altas cantidades de colesterol 40% del total de lípidos, mientras que en el verraco contienen mucho menos colesterol 22%. Además, el contenido de esteroides celulares ha sido relacionado con la duración de la capacitación. En realidad, se ha demostrado que durante la capacitación espermática se reduce la cantidad de colesterol, mientras que pequeñas cantidades de desmosterol, sulfato de colesterol y ésteres de colesterol pueden ser encontrados ([Travis y Kopf., 2002](#)).

En cualquier caso, junto con el retiro del colesterol la superficie de la célula espermática se altera durante la capacitación, esto es en parte debido a la remoción de los componentes del glicocálix y a la absorción de nuevos componentes del fluido del tracto genital femenino ([Revah., 2000](#)). Es decir, el colesterol es una molécula importante de la MP del espermatozoide, Se ha encontrado que en las células espermáticas capacitadas *in vitro* en un medio adicionado con albúmina, disminuye su contenido marcadamente por encima del 40%. En varias especies de mamífero esta disminución del contenido de colesterol

mediada, por albúmina, solamente ocurre cuando el medio capacitante contiene bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) (*Gadella et al., 1996*), pero no en ausencia de éste; también experimentalmente se han utilizado ciclodextrinas para remover el colesterol de las células espermáticas, aun sin ser capacitadas, y en contraste con la albúmina debido a la alta afinidad que tiene por el colesterol, estas no requieren del  $\text{NaHCO}_3$  para extraer el colesterol. Además se ha observado que cuando las células espermáticas son incubadas en un medio capacitante adicionado con ciclodextrinas, ocurre una activación rápida y significativa tanto de la proteína cinasa A (PKA) como de las proteínas tirosin cinasas (PTK<sub>s</sub>) (*Visconti et al., 1999*).

### **Asimetría de la membrana plasmática**

Las membranas son un ensamble dinámico de proteínas y lípidos capaces de responder a las señales ambientales que modifican funciones celulares específicas. Los cambios en la topografía membranal, o la redistribución de las moléculas de la superficie celular dentro o fuera de regiones específicas, pueden considerarse como adaptaciones fisiológicas a las modificaciones ambientales (*Alberts et al., 2002*).

De acuerdo al modelo de “mosaico fluido”, de las membranas biológicas (**figura 3**) las proteínas o glicoproteínas están asociadas con la bicapa de lípidos, que forman la matriz membranal mediante uniones no covalentes (*Alberts et al., 2002*). Así las proteínas intrínsecas que atraviesan totalmente la bicapa sólo pueden eliminarse mediante tratamientos severos, por ejemplo con el uso de detergentes; mientras que proteínas localizadas de uno u otro lado de la membrana (periféricas), y asociadas con la membrana principalmente mediante interacciones electrostáticas, pueden eliminarse por medio de agentes quelantes o modificando el pH o la fuerza iónica del medio. Como se mencionó la capacitación espermática involucra principalmente cambios en las proteínas superficiales de la MP (*Langlais y Roberts, 1985, Fusi et al., 1992, Yanagimachi, 1994*).

Todas las membranas biológicas poseen moléculas expuestas en la superficie (proteínas) que actúan como receptores para diversos compuestos exógenos como enzimas, hormonas, proteínas, etc. En el caso de espermatozoides humanos se han identificado receptores membranales a moléculas como nucleótidos cíclicos (cAMP), esteroides (17- $\beta$ -estradiol y P<sub>4</sub>) y glicosaminglicanos (heparina), cuya actividad se modifica durante la capacitación *in vitro* (Reyes et al., 1990, Baldi et al., 1995, Blackmore et al., 1999).

En cuanto a los componentes fosfolipídicos de la MP de los espermatozoides, estos se encuentran asimétricamente distribuidos, de manera semejante a como acontece en la MP de las células somáticas. Diversos métodos han revelado que los fosfolípidos como SM y en menor grado PC, se encuentran principalmente en la cara externa de la membrana (Müller et al., 1996 y Gadella et al., 1999). Los aminofosfolípidos como PE y especialmente la PS están localizados en mayor proporción en la cara interna (Hinkovska et al., 1986 y Rana et al., 1993). Es importante resaltar que por el hecho de que el 100 % de PS se encuentre en la cara interna, la presencia de ésta en la cara externa es considerada como indicador de la pérdida de la asimetría de la membrana (Kuypers et al., 1996). La anexina-V es una proteína de unión fosfolipídica que en presencia de concentraciones adecuadas de Ca<sup>2+</sup> tiene una alta afinidad por la PS, por lo cual ha sido utilizada en el desarrollo de técnicas para detectar la pérdida de la asimetría de la membrana en diferentes tipos celulares (Dachary-Prigent et al., 1993, Kuypers et al., 1996, Rosales-Torres et al., 2000, Ávalos-Rodríguez et al., 2004).

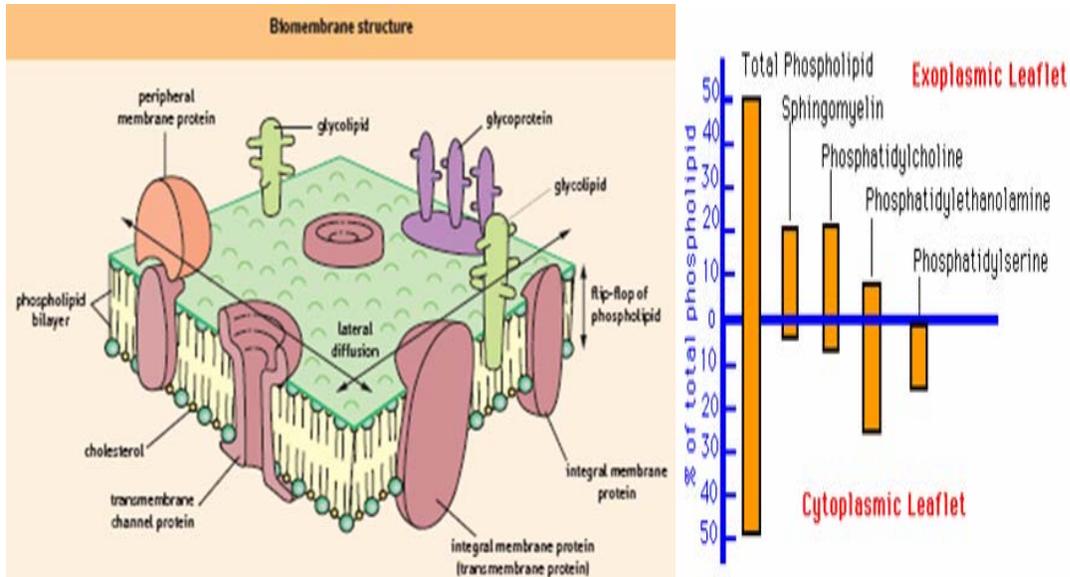
Los lípidos estructurales de las bicapas se encuentran en asimetría, dicho equilibrio está dado por un balance de dos mecanismos, primero todos los fosfolípidos difunden pasivamente a través de la bicapa, a una velocidad relativamente baja. Segundo los aminofosfolípidos son transportados activamente de la cara externa de la membrana hacia la cara interna por la acción de una enzima denominada translocasa de aminofosfolípidos dependiente de ATP y Mg<sup>2+</sup>, la cual mantiene el equilibrio de la membrana. Estudios realizados en eritrocitos

han podido demostrar que los aminofosfolípidos son transportados desde la cara externa hasta la cara interna de la membrana por la aminofosfolípido translocasa, y que este movimiento es responsable de la distribución asimétrica de los fosfolípidos en los eritrocitos, así como en la membrana de otras células eucariotas (*Devaux., 1990, Schroit et al., 1991*). Cuando en la lámina externa de la bicapa aparece la PS, ésta es rápidamente devuelta hacia la lámina interna por la translocasa de amino fosfolípidos (*Kuypers et al., 1996, Devaux y Morris., 2004*).

Inicialmente la distribución asimétrica de fosfolípidos es generada durante la biogénesis de las membranas, lo cual es realizado por enzimas translocadoras de fosfolípidos. Las moléculas lipídicas que más participan en la asimetría de la membrana son los glicolípidos, los cuales se caracterizan por estar únicamente en la monocapa externa, quedando los carbohidratos al descubierto exclusivamente en la superficie de la célula (*Frits et al., 2000*).

El movimiento de fosfolípidos de la cara externa hacia la cara interna de la membrana se denomina “flip” y el movimiento de los fosfolípidos de la cara interna hacia la externa se denomina “flop” (*Kuypers, et al., 1996*). Bajo la mayoría de las condiciones el mecanismo de “flip-flop” es extraordinariamente lento y su tiempo medio se mide en intervalos de horas o semanas (*Homan, et al., 1988, Boon y Smith., 2002*). Debido a esto, las enzimas translocasas han sido descritas como las importantes en la regulación de la distribución asimétrica de los fosfolípidos de las membranas (*Muller et al., 1996, Frits et al., 2000*). Estas enzimas llamadas también “flipasas” regulan una rápida translocación de fosfolípidos por el movimiento de “flip-flop” (*Muller et al., 1996*). Las aminofosfolípido translocasas pueden ser bloqueadas por vanadato o por algún otro sistema que inhiba la producción de ATP (*Backer et al., 1987*). Por el contrario, la actividad de “flip-flop” de los fosfolípidos puede ser incrementada significativamente por la incorporación de antibióticos formadores de canales iónicos, como la Anfotericina B y de probióticos como el Ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  A-23187 (*Schneider, et al., 1986*). Desde hace mucho tiempo se conoce que ciertos ionóforos como el A-23187 son capaces de unir y transportar cationes divalentes como el  $\text{Ca}^{2+}$  a través de

barreras lipídicas incluyendo las membranas celulares (*Case et al., 1974*). También se sabe que la pérdida de la asimetría fosfolipídica de la MP es un mecanismo importante de señalización, en donde la presencia de fosfolípidos específicos en lados opuestos de la membrana desencadena una variedad de respuestas celulares.



**Figura 3** Modelo de mosaico fluido y asimetría de la membrana plasmática. Imagen clásica de los componentes estructurales de la membrana plasmática, donde se resalta la distribución asimétrica de los fosfolípidos, como se aprecia en la imagen la fosfatidilserina se encuentra distribuida en su totalidad en la lámina interna (*Rana et al., 1993, Pomorski et al., 2004*).

### Fosfatidilserina

Fosfatidilserina o 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfo-L-, es el único glicerofosfolípido que contiene el aminoácido serina en las células animales que contiene. Aunque está ampliamente distribuido entre animales, plantas y microorganismos. Usualmente es menos del 10% del total de fosfolípidos, en los animales, la mayor concentración se encuentra en el tejido cerebral y en la mielina. Es un fosfolípido aniónico con tres grupos ionizables; la porción fosfato, el grupo amino y el grupo funcional carboxilo. Como cualquier otro lípido con carácter ácido, de manera natural existe en forma de sal (*Buckland y Wilton, 2000*).

Durante la maduración espermática, la PS es sintetizada en el retículo endoplásmico (RE) de la célula o en una subfracción celular llamada membrana asociada a la mitocondria, por reacción de L-serina con PC o PE, catalizada por la fosfatidilserina sintasa I, y después es transportada a la mitocondria, donde es descarboxilada a PE, la cual regresa al (RE) y es convertida a PS por la acción de la fosfatidilserina sintasa II ([Vance Steenbergen., 2005](#)).

Durante la activación de las plaquetas la PS localizada principalmente en la cara interna de la MP, pasa a la cara externa ahí la PS participa en la activación de protrombina a trombina directamente ([Bevers et al., 1996](#), [Lentz., 2003](#)) y por otra parte, durante la apoptosis celular una de las enzimas estimuladas es la escramblasa, la cual puede transportar PS en ambas direcciones a través de la MP, y una de las inhibidas es la aminofosfolípido translocasa, la cual regresa al fosfolípido a la cara interna de la MP, sirviendo tal externalización de la PS para que los macrófagos pueden reconocer a la célula dañada y fagocitarla ([Tyurina et al., 2000](#), [Oosterhuis y Vermes et al., 2004](#)). Adicionalmente la esfingomielinasa ácida al hidrolizar a la esfingomielina y producir ceramidas (2º mensajero), ocasiona que la misma esfingomielina pase a la cara interna de la MP y, por diferencia de carga, induce la exposición de PS en la cara externa de la MP a través de las enzimas translocadoras de aminofosfolípidos ([Tyurina et al., 2000](#), [Kagan et al., 2000](#)).

### **Flipasas**

La actividad de la aminofosfolípido translocasa fue descrita primera vez por [Seigneuret y Devaux en \(1984\)](#), quienes midieron la translocación de los lípidos utilizando análogos marcados en los eritrocitos humanos. Los fosfolípidos marcados con ácidos grasos fluorescentes, particularmente 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-y1 (NBD) y sus derivados, también han sido utilizados extensamente para estudiar este transportador ([Connor y Schroit., 1987](#), [Colleau et al., 1991](#)). Sin embargo, la agregación de los análogos fosfolipídicos podría alterar las interacciones con los transportadores, cuestionandose si los movimientos medidos con estos fosfolípidos realmente reflejan la conducta de lípidos endógenos. Por

ello aunque el uso de los fosfolípidos fluorescentes es una herramienta muy poderosa, su uso requiere de la interpretación cuidadosa ([Devaux et al., 2002](#), [Maier et al., 2002](#)).

Por otra parte el transporte catalizado por las flipasas es dependiente de ATP y  $Mg^{2+}$  ([Anzai et al., 1993](#), [Daleke, 2003](#)) por lo que puede ser inhibida por el tratamiento de las células con vanadato ([Seigneuret y Devaux., 1984](#)). La estequiometría de transporte es de aproximadamente una molécula de ATP consumida por cada lípido que transporta ([Beleznay et al., 1993](#)). La actividad de las flipasas es sensitiva a la temperatura y a un número no específico de agentes, incluyendo oxidantes del grupo sulfhídrido y agentes alquilantes ([Daleke y Huestis, 1985](#), [Connor y Schroit, 1990](#), [Connor et al., 1992](#)). Su actividad también es inhibida por altas concentraciones de  $Ca^{2+}$  ([Bitbol et al., 1987](#), [Graham., 2004](#)), indicando que la actividad de esta enzima podría estar regulada en células activadas.

Las flipasas se encuentran ampliamente distribuidas en muchas MP, por ejemplo en la de los eritrocitos ([Connor y Schroit, 1989](#), [Mathews et al., 2003](#)), incluyendo plaquetas, linfocitos ([Zachowski et al., 1987](#)), células endoteliales aórticas ([Julien et al., 1993](#)), fibroblastos ([Pomorski et al., 1996](#)), hepatocitos ([Müller et al., 1996](#)) y espermatozoides ([Müller et al., 1994](#), [Pomorski et al., 1999](#)). Es probable que este transportador sea esencial para algunas membranas que requieran mantener la asimetría de PS. La aminofosfolípido flipasa es quizás la más selectiva de los transportadores lipídicos, ya que prefiere PS por sobre otros fosfolípidos ([Manodori y Kuypers, 2002](#)) y la especificidad está definida por cada grupo funcional del fosfolípido. El grupo amino es absolutamente requerido, por ejemplo el fosfatidilhidroxipropionato es un análogo de PS, que sin el grupo amino no es un sustrato para ser transportado ([Daleke et al., 1995](#)). Si bien la enzima puede tolerar la monometilación de PS, la metilación progresiva de PS reduce significativamente su transporte; Además aunque el grupo carboxilo no es esencial, su ausencia disminuye el transporte del fosfolípido por lo menos diez veces, y la metil esterificación del grupo carboxilo reduce la actividad de transporte

de manera significativa ([Daleke et al., 1995](#), [Jonson et al., 1998](#), [Hoffmann et al., 2001](#) y [Fadok et al., 2001](#)).

### **Flopasas**

Las flopasas son la segunda clase de transportadores fosfolipídicos dependientes de ATP, transportan fosfolípidos de la cara interna hacia la cara externa de la MP, estudios en eritrocitos han revelado su inespecificidad para transportar fosfolípidos sintéticos y naturales hacia la cara externa de la MP ([Connor et al., 1992](#)).

Los transportadores ABC son un grupo diverso de proteínas dependientes de ATP, que en general son responsables de transportar componentes anfipáticos ([Borst et al., 2000 y 2002](#)). Esta familia incluye a las proteínas de resistencia a multidroga, las cuales transportan xenobióticos citotóxicos y fueron descubiertas primero en células tumorales. Algunos miembros de esta clase muestran especificidad única por su respectivo sustrato. ABCA1, ABCB1, ABCB4 y ABCC1, han sido los mejores caracterizados con actividad flopasa ([Doerrler y Ratees, 2002](#)). Es importante aclarar que no todos los transportadores lipídicos ABC son flopasas, por ejemplo, la actividad transportadora lipídica, del transportador ABCR de flipasa ([Weng et al., 1999](#)).

### **Escrabladas**

Una familia de proteínas de membrana llamadas escrambladas, también ha sido implicada en la dispersión aleatoria de los fosfolípidos, que ocasionan la asimetría de los mismos en procesos que dependen de elevadas concentraciones citoplásmicas de  $\text{Ca}^{2+}$ ; su máxima actividad la realizan con 75 mM de  $\text{Ca}^{+2}$  libre citoplásmico ([Zhao et al., 1998a](#), [Woon et al., 1999](#)). Cuatro genes han sido identificados que codifican para escrambladas de fosfolípidos en humanos y ratones y todos han sido conservados a través de la evolución ([Viedmer et al., 2000](#)). La secuencia de aminoácidos de una de las escrambladas de fosfolípidos humana (HuPLSCR1), indica que la misma es una proteína de membrana tipo II de peso molecular de 35kDa (318 residuos de aminoácidos), con un dominio en hélice transmembranal localizado próximo al carbono C-terminal ([Zhou et al.,](#)

1997), el dominio N-terminal citoplásmico posee un posible sitio de fosforilación y un segmento de unión al  $\text{Ca}^{2+}$ . Existe evidencia de que la regulación de la actividad de la escramblasa puede ser mediada por fosforilación en presencia de proteína cinasa  $\text{C}\sigma$  ( $\text{PKC}\sigma$ ), lo cual resulta en la exposición de PS en la superficie de la MP de células apoptóticas (Frasch et al., 2000). La escramblasa prefiere a los análogos de los glicerofosfolípidos y son más sensitivas al tamaño de la cabeza del grupo polar (Dekkers et al., 2002), por lo que son selectivas y sirven de manera primaria para transportar PS a la superficie de células activadas (Di Vittorio et al., 2005).

### **Capacitación espermática**

La superficie de los espermatozoides maduros presenta regiones con diferentes propiedades bioquímicas y/o funcionales que participan específicamente en eventos como la RA y la fusión de gametos. Para que estos procesos puedan efectuarse se requieren de las modificaciones o rearrreglos de estas regiones membranales, que se llevan a cabo durante la capacitación (Langlais y Roberts, 1985).

El proceso de capacitación espermática fue descrito por primera vez en el año de 1951 (Austin, 1951). En los mamíferos los espermatozoides experimentan una serie de cambios antes de que adquieran su capacidad para fertilizar. Estos cambios se conocen como capacitación y reacción acrosomal, la capacitación espermática es una serie de cambios bioquímicos que se manifiestan en la MP del espermatozoide, y que preparan a la célula para la RA, estos mismos cambios también pueden provocarse *in vitro* utilizando numerosas condiciones experimentales (Brackett y Oliphant., 1975, Rosado, 1988, Marina, 2001 y Ávalos-Rodríguez et al., 2004).

Durante la incubación *in vitro* de los espermatozoides se producen modificaciones físicas y bioquímicas en la MP, que han sido relacionadas con los cambios que supuestamente ocurren durante la capacitación *in vivo*, por ejemplo: la presencia de un patrón característico de movilidad espermática (hiperactivación) asociado

con la etapa final de la capacitación; la activación del metabolismo energético y de todos sus sistemas enzimáticos (*Rogers y Perreault., 1990, Aitken et al., 1995*); la eliminación o modificación de algunos componentes superficiales absorbidos o integrados en la MP durante la maduración epididimaria y/o por contacto con el plasma seminal, que actúan como factores descapacitantes (*Oliphant et al., 1985, Drisdell et al., 1995*); la disminución de la carga neta negativa superficial, aparentemente por la eliminación de ácido siálico y de algunos compuestos sulfatados (*Lassalle y Testart., 1994*); modificaciones en la distribución de antígenos de superficie (*Myles y Primakoff., 1984, Okabe et al., 1987 y Yanagimachi, 1994*); modificaciones en la conformación de las proteínas propias de la membrana (*Yanagimachi, 1994*); cambios en la permeabilidad membranal a los iones, principalmente al  $\text{Ca}^{2+}$  (*Baldi et al., 1991, Chavarría et al., 1996 y Yanagimachi, 1982*), al  $\text{Na}^+$  (*Chavarría et al., 1996, Fraser, 1994 y Hyne et al., 1984*), al  $\text{K}^+$  (*Chavarría et al., 1996 y Rogers et al., 1981*) y a los protones (*Ashraf et al., 1982*).

La necesidad de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio extracelular, para la inducción de la hiperactivación del espermatozoide, ha quedado bien demostrada, en los espermatozoides de cobayo, ratón y hámster; ya que su incubación en medios desprovistos de  $\text{Ca}^{2+}$ , no les permite mostrar los movimientos típicos de ese patrón de movilidad, pero cuando se agregan concentraciones adecuadas de  $\text{Ca}^{2+}$  (2.5 mM), los espermatozoides inician casi inmediatamente las modificaciones en la movilidad que caracteriza la hiperactivación (*Fraser, 1983, Yanagimachi, 1982*).

Los espermatozoides eyaculados se pueden unir a la ZP del ovocito sólo después de haber sido activados en el tracto reproductor femenino (*Fraser, 1998*). La activación del espermatozoide (capacitación), es un evento muy complicado y a pesar de que ha sido estudiada aún no se tiene un conocimiento preciso de los mecanismos que concurren a que acontezca de manera fisiológica. Los cambios a nivel de la MP del espermatozoide se inducen durante la capacitación se describen a continuación, los cuales también tienen que ver con la aceleración de

su metabolismo, modificación del patrón de movilidad y el aumento en la afinidad por la ZP ([Harkeman et al., 1998](#)).

En diferentes especies de mamíferos se han identificado cambios característicos en la movilidad espermática asociados con la etapa final de la capacitación y el disparo de la RA, tanto *in vivo* como *in vitro*: estos cambios en el patrón de movilidad se conocen genéricamente con el término de "hiperactivación", proceso descrito por primera vez en el hámster ([Austin, 1951](#)) y evidenciado después en numerosas especies. Durante la capacitación y antes de comenzar la RA, los espermatozoides adquieren un movimiento vigoroso, caracterizado por un aumento en la frecuencia y en la amplitud de movimientos del flagelo lo que le proporciona un gran empuje para avanzar a través del tracto reproductor de la hembra, en busca del ovocito ([Gafo et al., 1994](#)). La movilidad espermática es considerada como uno de los parámetros importantes en el proceso de fertilización, ya que participa tanto en el transporte de los espermatozoides hacia la región del ámpula en el oviducto, así como durante la interacción de los gametos y los eventos previos a la fusión de los mismos. El primer cambio en el patrón de movilidad que se observa *in vitro* coincide con la eliminación del plasma seminal ([Vega et al., 2002](#)).

La composición de los fosfolípidos y su relación molar con el colesterol regulan la fluidez y la permeabilidad iónica en todas las membranas biológicas ([Alberts et al., 2002](#)). Durante la capacitación se ha encontrado una disminución en la cantidad de colesterol y una disminución en la relación molar colesterol/fosfolípidos (c/f) ([Davis, 1981](#), [Huacuja et al., 1981](#), [Langlais et al., 1981](#), [Benoff et al., 1993](#), [Ren et al 2001](#), [Quill, et al., 2003](#)).

[Langlais, et al., \(1981\)](#) y [Davis, \(1982\)](#), propusieron un mecanismo para explicar el proceso de la capacitación y confirman que los medios capacitantes actúan induciendo la liberación de colesterol de la membrana del espermatozoide, lo cual provoca una disminución en la relación c/f y un aumento de la permeabilidad de la membrana, particularmente para la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . El  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular es

requerido para completar la capacitación, cuya concentración está mediada por una ATPasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , todos estos acontecimientos preceden a la RA ([Fraser, et al., 1992](#)).

Durante la capacitación los espermatozoides experimentan alteraciones en su expresión antigénica, por ejemplo el antígeno PH 20, localizado exclusivamente en la región posterior de la cabeza de los espermatozoides con acrosoma intacto, migra después de la incubación en condiciones capacitantes hacia la región anterior de la cabeza y después de que se lleva a cabo la RA, puede encontrarse en la membrana acrosomal interna ([Primakoff y Myles., 1983](#)).

Existen evidencias que durante y después de la eyaculación algunos componentes del plasma seminal (glicoproteínas, polipéptidos, proteínas) se fijan firmemente en la superficie de los espermatozoides inhibiendo su capacidad fertilizante ([Yanagimachi, 1994](#)). Se ha sugerido que los factores descapacitantes actúan en la MP del espermatozoide bloqueando receptores, grupos funcionales, enzimas, mecanismos o canales de intercambio iónico, y que sus funciones incluyen la protección de la integridad de los espermatozoides durante su estancia en el ambiente vaginal, así como la inhibición de la RA en regiones del aparato genital femenino que no son las apropiadas ([Oliphant et al., 1985](#), [Yanagimachi, 1994](#)).

El  $\text{NaHCO}_3$  juega un papel importante en la inducción de capacitación *in vitro* de las células espermáticas ([Boatman y Robbins, 1991](#), [Suzuki et al., 1994](#), [Shi y Roldan, 1995](#) y [Visconti et al., 1995](#)). En los espermatozoides de cerdo, el  $\text{NaHCO}_3$  modifica la superficie de la MP, incrementa el desorden lipídico ([Harrison et al., 1996](#)), aumentando la afinidad de unión hacia la ZP ([Harkema et al., 1998](#), [Flash et al., 2001](#)), y el movimiento de transporte de fosfolípidos en la bicapa de la región apical del espermatozoide ([Gadella y Harrison., 2000](#), [Gadella y Harrison., 2002](#)). También se ha visto que el fluido oviductal y los medios para fertilización *in vitro* (IVF) contienen altos niveles de  $\text{NaHCO}_3$  (humano IVF+- 24 mM), en contraste el semen eyaculado solo contiene < 1 mM, por lo que es probable que el

NaHCO<sub>3</sub> bajo condiciones mayores a 1mM induzca el movimiento aleatorio de los fosfolípidos hasta aproximadamente el 40% de los espermatozoides tratados, mediante la acción de las escramblasas ([Vries et al., 2003](#)).

Se ha encontrado que la exposición de PS en la superficie de la MP de células espermáticas capacitadas *in vitro* depende del NaHCO<sub>3</sub> (15 mM), restringiéndose esto a la región apical del espermatozoide. El incremento celular de NaHCO<sub>3</sub> directamente activa a la adenilato ciclasa (AC) e induce la formación del adenosin monofosfato cíclico (cAMP), el cual a su vez activa a proteín cinasa A (PKA) ([Chen et al., 2000](#)), esta cascada de señalización induce alteraciones en la arquitectura de la MP del espermatozoide.

[Gadella y Harrison en el 2003](#), reportaron una escramblasa de fosfolípidos dependiente de NaHCO<sub>3</sub>, limitada a la región apical del espermatozoide de verraco, y en el mismo año [Vries et al.](#), reportaron una isoforma (25 kDa) de esta escramblasa en espermatozoides de humano. También se observó que las células espermáticas incubadas sin NaHCO<sub>3</sub> no muestran exposición de aminofosfolípidos en su superficie, sin embargo en presencia de NaHCO<sub>3</sub> una población variable de espermatozoides expone PS en la cara externa de la MP de la región apical, esto fue detectado mediante el uso de anexina V-FITC ([Vries et al., 2003](#)).

El papel del cAMP como segundo mensajero es generalmente activar a PKA para fosforilar proteínas celulares específicas en células espermáticas de verraco. Esta cascada de señalización está involucrada en la activación de los movimientos transmembranales por estimular la exposición de los aminofosfolípidos ([Chen et al., 2000](#), [Gadella y Harrison, 2000 y 2002](#)).

La exposición de aminofosfolípidos en la cara externa de la MP es un indicador temprano de apoptosis en muchos tipos celulares, pero también se ha asociado a otros eventos celulares tales como exocitosis y adhesión celular ([Tepper et al., 2000](#)). Las proteínas de membrana, por regla general, no sobresalen desnudas al exterior celular, sino que están cubiertas por carbohidratos. Los carbohidratos se

encuentran en forma de cadenas de oligosacáridos unidas covalentemente a las proteínas de membrana (glicoproteínas) y a lípidos (glicolípidos). El término cubierta celular o glicocálix se utiliza para describir la zona de la superficie celular rica en carbohidratos ([Alberts et al., 2002](#)). El glicocálix es importante en la comunicación intercelular de los gametos, este también forma parte de la capa extracelular de la superficie del espermatozoide. Además de esto, la polarización natural del glicocálix podría ser relevante para la organización de las moléculas de la MP a través de las cadenas de carbohidratos, que están en contacto directo con la MP del espermatozoide vía las proteínas integrales de la membrana y los glicolípidos.

El glicocálix se altera durante la capacitación, como fue mostrado por estudios con lectinas ([Yanagimachi, 1994](#)). La redistribución de glicolípidos durante la capacitación se atribuye a la liberación de factores descapacitantes durante la capacitación ([Adeoya-Osiguwa y Fraser, 1998](#)) y otros factores que se unen a la MP ([Töpfer-Petersen et al., 1998](#)). Se ha establecido que la eliminación de los factores descapacitantes inducen la actividad de tirosin cinasa en proteínas transmembranales ([Yanagimachi, 1994](#)), y que la interacción de estas proteínas transmembranales con la ZP conduce a la agregación de más proteínas transmembranales y el subsecuentemente incremento en la actividad de las tirosinas. Además la eliminación de componentes superficiales dejan al descubierto los receptores para progesterona ( $P_4$ ) en la MP del espermatozoide. Se ha demostrado que los espermatozoides tomados de la cola del epidídimo de perros, tienen una gran afinidad por la  $P_4$  (90%), mientras que los espermatozoides de eyaculados no la tienen, ello debido a que algunos factores que se agregan a la membrana se secretan en la próstata ([Sirivaidyapong et al., 1999](#)). Los espermatozoides que exponen receptores funcionales a  $P_4$  son los que inician la RA cuando se estimulan con esta hormona ([Sirivaidyapong et al., 1999](#), [Cheng et al., 1998](#)).

## **Reacción acrosomal**

La RA es un proceso fisiológico natural que se presenta en el espermatozoide después del proceso de capacitación, esto ocurre a nivel del tracto genital femenino en condiciones naturales, la RA se inicia inmediatamente después de la unión primaria del espermatozoide a la ZP del ovocito ([Wassarman, 1992](#)). Durante la RA la MP apical de la cabeza del espermatozoide se fusiona con la membrana acrosomal externa en múltiples sitios, lo que desencadena la liberación del contenido acrosomal ([Saling et al., 1979](#)). Las enzimas hidrolíticas liberadas del acrosoma sirven para hidrolizar y disolver la matriz de la ZP de manera local en la dirección inmediata de la penetración del espermatozoide, lo cual finalmente asegura la entrada del espermatozoide al espacio perivitelino ([Llanos et al., 1993](#), [Patrat et al., 2000](#)). Diversos estudios apoyan la evidencia de que la RA es un indicador claro de que ya se ha realizado la capacitación espermática ([Frits et al., 2000](#)). A pesar de las investigaciones que se han hecho relacionadas al tema, todavía existe cierta controversia acerca de si la RA debe considerarse como la parte terminal de la capacitación espermática o por el contrario, como un fenómeno independiente, pero está bien demostrado que para que los espermatozoides puedan fertilizar al ovocito requieren estar previamente capacitados y experimentar la RA ([Reyes y Chavarría., 1987](#), [Florman y First., 1988](#), [Kumakiri et al., 2003](#)).

## **Canales iónicos**

Los canales iónicos son proteínas transmembranales que permiten el paso selectivo de iones específicos cuando están abiertos ([Alberts et al., 2003](#)). El inicio de la RA, al igual que en otros eventos de fusión membranal, es dependiente de un incremento masivo de las concentraciones intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células espermáticas ([Naz et al., 1991](#), [Bailey y Storey, 1994](#), [Landin-Alvarenga et al., 2004](#)). Se requiere de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular para la capacitación espermática y para la RA ([Visconti et al., 1995](#), [Kaul et al., 1997](#)). Concentraciones bajas de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (90  $\mu\text{M}$ ) en combinación con ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  inducen solo la

capacitación pero no la RA en espermatozoides de ratón, mientras que concentraciones extracelulares altas (1.8 mM) son apropiadas para inducir la RA (*Fraser y McDermott, 1992, Jagannathan et al., 2002*).

La MP del espermatozoide tiene diferentes formas para introducir  $\text{Ca}^{2+}$  al interior de la célula:

- a).- Canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje (*Benoff, 1998*).
- b).- ATPasas de  $\text{Ca}^{2+}$  (*Ashraf et al., 1994*).
- c).- Intercambiadores de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (*Rufo et al., 1984*).

Además en el acrosoma se ha descrito la presencia de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivos a inositol trifosfato (IP3) (*Walensky y Zinder, 1995*) así como la presencia de una ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$ , esto sugiere que el acrosoma podría servir como un regulador intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . No obstante el  $\text{Ca}^{2+}$  acrosomal podría estar secuestrado por proteínas o como cristales debido al pH ácido del acrosoma (*Martínez-Menarguez et al., 1996*). Debe recordarse que los espermatozoides carecen de retículo endoplásmico, y que las mitocondrias no están localizadas en la cabeza del espermatozoide por lo que estas últimas no pueden influir en las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ . Además se ha postulado que el  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma de los espermatozoides se acumula en bajas concentraciones, por la sensibilidad de la calmodulina (ATPasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ ). La inhibición de la calmodulina, produce un incremento en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , que se refleja en una mayor proporción de espermatozoides capacitados (*Adeoya-Osiguwa y Fraser, 1993, Fraser et al., 1995*). Por otra parte, sin embargo la inhibición de los intercambiadores de  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ , por un péptido de plasma seminal de 10 kDa (caltrina), previene los aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  en los espermatozoides del bovino (*Rufo et al, 1984*). La PKC y los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje dependiente parecen estar también involucrados en el incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  interno (*Córdoba et al., 1997*), a este respecto la despolarización de la MP es un prerrequisito para que la ZP desencadene la RA (*Zeng et al., 1995, Arnoult et al., 1996, Cardona-Maya y Cadavid., 2005*).

## Transporte de iones

Las concentraciones de aniones y cationes en las secreciones del aparato genital femenino, varían dependiendo de la etapa del ciclo y de las condiciones fisiológicas de la hembra. Sin embargo los espermatozoides viables mantienen concentraciones iónicas intracelulares precisas que son diferentes de las que predominan en el medio ambiente, por lo tanto, la relación iónica intra/extracelular no es constante y se modifica durante la capacitación (*Chavarría et al., 1996, DasGupta et al., 1993, Fraser et al., 1993, Fraser, 1994*). Los movimientos iónicos tienen como resultado la activación de enzimas como la AC y enzimas de origen acrosomal y, han sido asociados también con los cambios en las características de la movilidad durante la capacitación (*Foresta et al., 1993, Thomas y Meizel., 1989, Yanagimachi, 1994*). Los gradientes iónicos a través de la MP del gameto masculino se regulan principalmente mediante ATPasas dependientes de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y/o  $\text{Ca}^{2+}$ , así como sistemas de intercambio iónico o antiportadores (*De Jonge et al., 1993, Foresta et al., 1993, Llanos, 1994*). *Gordon et al., 1978*, reportaron la presencia de una ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana acrosomal externa de los espermatozoides de cobayo, sugiriendo que esta enzima bombea  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el acrosoma, estimulando la RA. En 1982, *Ashraff et al* encontraron a esta enzima en la MP de la cabeza y del flagelo del espermatozoide del cerdo, mientras que *García et al., 1991* demostraron la presencia de una ATPasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana acrosomal externa de espermatozoides de cobayo.

## Fosforilación de proteínas

La fosforilación de proteínas tirosina, no solamente se ha implicado en la capacitación, sino también en la RA (*Leyton y Saling, 1989*). Así los inhibidores de tirosina cinasas bloquean la RA inducida por la ZP (*Leyton et al., 1992*). Se ha reportado que la capacitación espermática resulta en la translocación de la fosfolipasa C gamma ( $\text{PLC}\gamma$ ) lo cual se cree es resultado de la fosforilación de tirosinas (*Tomes et al., 1996*). Aunque la RA inducida por la ZP puede ser bloqueada por los inhibidores de tirosina cinasas, ni la movilidad ni la RA inducida

con el ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$ , son bloqueadas, por lo tanto la capacitación, no se ve afectada (*Pukazhenti et al., 1998*). *Brewis et al (1998)*, demostraron que la ZP recombinante humana induce RA en los espermatozoides capacitados de la misma especie, lo que coincidió con un aumento en la fosforilación de tirosina de una proteína de 95 kDa. La  $\text{P}_4$  también es capaz de inducir la RA e induce la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en el espermatozoide. Por otra parte la inhibición de las tirosina cinasas reduce la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{P}_4$  (*Bonaccorsi et al., 1998*).

Además otras proteína cinasas podrían estar involucradas en la inducción de la RA. La estaurosporina, un inhibidor de la PKC, bloquea la RA inducida por la ZP en espermatozoides humanos y de otros mamíferos, pero no afecta su movilidad (*Breitbart et al., 1992, Lax et al., 1994, Liu y Baker, 1997*).

### **Proteínas G**

Las proteínas G son una familia de proteínas que tienen especial afinidad por los nucleótidos de guanina, y desempeñan un papel muy importante en la transducción de señales de las células eucariotas (*Brandelli, 1997*). En 1971 se observó que el guanosin trifosfato (GTP) era necesario para la activación de la AC. Se sabe que cuando un agonista se une a su receptor, el receptor adquiere una conformación que le permite interactuar con una determinada proteína G que se encuentra en estado inactivo y se produce un complejo transitorio. El acoplamiento del receptor activado con la región amino terminal de la subunidad alfa de la proteína g ( $\text{G}\alpha$ ) induce cambios conformacionales que conducen al intercambio del guanosin di fosfato (GDP) por GTP; el complejo  $\text{GTP}-\alpha, \beta, \gamma$ , subunidades de la proteína G inducen la liberación de la porción  $\text{GTP}-\alpha$  que participa en la activación o inhibición del efector molecular que puede ser la AC, o bien, puede participar en forma directa en la apertura de canales iónicos (*Brucker et al., 1995, Frits et al., 2000, Alberts et al., 2003*).

Ya que las proteínas G virtualmente participan en la señalización de todas las células de los mamíferos (*Wess, 1997*), muy probablemente estén involucradas en la RA. Los espermatozoides del mamífero poseen un subgrupo de proteínas G

distribuidas sobre diferentes regiones que incluyen el segmento ecuatorial y el acrosoma ([Garty et al., 1988](#), [Merlet et al., 1999](#)). Además la RA inducida por ZP puede ser inhibida por la toxina Pertussis, un inhibidor de las proteínas  $G_i$ , sin afectar la unión con la ZP ([Wilde et al., 1992](#), [Córdoba et al., 1997](#)). La ZP induce la agregación de  $\beta$ 1,4-galactosil-transferasa y se ha sugerido que activa a las proteínas G en el espermatozoide de ratón ([Gong et al., 1995](#)). La activación de las proteínas G por la unión de la ZP se sabe aumenta la actividad de la AC ([Leclerc y Kopf, 1999](#)). Además, la unión con ZPC induce la alcalinización del citoplasma vía proteína  $G_i$  y canales de cationes poco selectivos (insensible a la toxina Pertussis) ([Arnoult et al., 1996](#)). Los efectos concernientes a la alcalinización y despolarización aparentemente abren canales de  $Ca^{2+}$  sensibles a voltaje ([Arnoult et al., 1996](#)).

### **Progesterona**

La  $P_4$  es una hormona producida principalmente por las células del cuerpo lúteo del ovario y la placenta, aunque también es producida por las células foliculares parcialmente luteinizadas antes de la ovulación. En el espermatozoide de humano bajo condiciones *in vitro*, la  $P_4$  a una concentración de 17 ng/ml induce el influjo de  $Ca^{2+}$  y cuando la concentración se eleva a 31.45 ng/ml, es capaz de inducir el movimiento de hiperactividad y la RA.

Durante la capacitación, la eliminación de componentes superficiales deja al descubierto los receptores para  $P_4$  en la MP del espermatozoide. Se ha demostrado que los espermatozoides de perro, obtenidos de cola de epidídimo, más del 90% tienen afinidad por la  $P_4$ , mientras que los de eyaculados no la tienen, se ha sugerido que esto se debe a que algunos factores secretados en la próstata, se agregan a la membrana de la célula ([Sirivaidyapong et al., 1999](#)). Los espermatozoides que exponen receptores funcionales a  $P_4$  inician la RA cuando se estimulan con ésta ([Cheng et al., 1998](#), [Sirivaidyapong et al., 1999](#)). La vía por la cual en varias especies la  $P_4$  induce la RA es el incremento en las concentraciones de  $Ca^{2+}$  intracelular, por lo que posiblemente esta hormona activa directamente los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje ([Cheng et al., 1998](#)).

Los espermatozoides poseen receptores de membrana para  $P_4$  (receptores para  $P_4$  no genómicos) (*Blackmore y Lattanzio, 1991; Sabeur et al., 1996; Meyer et al., 1998*). Estos receptores difieren considerablemente de los genómicos localizados en el citosol encontrados en células somáticas (*Kumar y Thompson, 1999*).

Por lo anterior, es claro que la  $P_4$  y su derivado la  $17\alpha$ -hidróxiprogesterona, contenidas en el líquido folicular del folículo ovulatorio, inducen RA como se dijo antes a través de un mecanismo mediado por receptores específicos no genómicos, presentes en la MP del espermatozoide, particularmente sobre la región acrosomal (*Blackmore et al., 1990, 1991, 1993, Krausz et al., 1995, Giojalas, 1998*).

El líquido folicular humano contiene aproximadamente 10 ug/ml, contra 6ng/ml en el suero (*Libersky y Boatman, 1995*), este líquido folicular es liberado durante la ovulación, por lo tanto la ZP puede estar impregnada con altos niveles de  $P_4$ . *In vitro* concentraciones de 0.3 ug/ml de  $P_4$  son capaces de inducir la RA en varias especies de mamíferos (*Osman et al., 1989, Baldi et al., 1991, Meléndrez et al., 1994*). Se sugiere que la  $P_4$  actúa vía receptor ácido gama amino butírico (GABA)/canal Cl, esta idea es apoyada por el descubrimiento de que GABA se une a los espermatozoides humanos, por el hecho de que la  $P_4$  también estimula la entrada de cloro (Cl) (*Meizel y Turner, 1996*), y que este efecto de la  $P_4$  puede ser bloqueado por antagonistas del receptor GABA/canal Cl (*Roldan et al., 1994, Melendrez y Meizel., 1995*) En el espermatozoide la activación del receptor GABA por  $P_4$ , consecutivamente aumenta la actividad de la fosfolipasa C (PLC), y como consecuencia se incrementa la producción de diacilglicerol (DAG) (*Roldan et al., 1994*). La entrada de Cl a la célula causa la despolarización de la membrana y como consecuencia la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje (*Espinosa et al., 1998*). Además la RA mediada por  $P_4$  puede ser bloqueada por inhibidores de tirosina cinasas, lo cual sugiere que la fosforilación de proteínas tirosina puede ser una vía de acción de esta hormona (*Bonaccorsi et al., 1995*). Por lo tanto se sugiere que la  $P_4$  actúa vía fosforilación de proteínas tirosina (*Baldi et al., 1995, Thérien y Manjunath, 2003*).

### **Participación del calcio durante la reacción acrosomal**

Los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  juegan un papel importante en algunos procesos fisiológicos, por su habilidad para regular la estructura y función de las membranas celulares y por su participación en algunas vías metabólicas, particularmente aquellas involucradas en los procesos de contractibilidad y metabolismo energético. Se sabe que el incremento de la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, inducido por el ionóforo A-23187 o por incorporación de  $\text{Ca}^{2+}$  al medio, estimula la distribución al azar de los lípidos de la membrana, mediante la activación de la escramblasa de fosfolípidos (*Williamson et al., 1985, Williamson et al., 1992, Sulpice et al., 1994 y Woon et al., 1999*). El desorden que se produce en la membrana ocasiona la pérdida de la asimetría de los fosfolípidos de la membrana y posteriormente la formación de vesículas. La relación entre vesiculación y translocación de fosfolípidos se demostró por experimentos que indujeron vesiculaciones espontáneas en liposomas después de que se les indujo una redistribución transmembranal de los fosfolípidos (*Farge y Deveraux, 1992, Frits, et al., 2000, Kirkman-Brown, et al., 2002*).

El  $\text{Ca}^{2+}$  desempeña un papel fundamental en todos los mecanismos de exocitosis, incluyendo la RA, por ejemplo en el erizo de mar este fenómeno parece ser el resultado de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales dependientes de voltaje (*Guerrero y Darszon., 1989, Liévano et al., 1990*). En el caso de los mamíferos, una de las propiedades más importantes de la RA es que la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular es indispensable para que tal proceso ocurra, aunque no se ha demostrado la presencia de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana, semejantes a los descritos en el erizo de mar. Sin embargo se ha demostrado que la RA ocurre concomitantemente con un aumento en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  (*Meizel y Turner., 1993*). Los posibles sitios de depósitos de donde ocurriría la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  en el espermatozoide son la gota citoplásmica, el núcleo y el acrosoma. También se ha postulado que la vesícula acrosomal sirve como un almacenamiento de  $\text{Ca}^{2+}$ , sugerido por la presencia de receptores para inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) en la membrana acrosomal (*Walenski y Zinder, 1995*). Un

mecanismo posible de inducción de la RA, mediante movimientos de  $\text{Ca}^{2+}$  a partir de depósitos intracelulares, incluye la participación del aumento en la concentración intracelular de guanosin monofosfato cíclico (cGMP) y la activación de la sintetasa de óxido nítrico (NOS) ([Xu et al., 1994](#)).

Además de lo anterior, es decir, del aumento de la concentración intracelular del  $\text{Ca}^{2+}$ , se produce la activación de la fosfolipasa A2, la cual causa modificaciones en los lípidos de las membranas y por lo tanto, favorece la fusión de las membranas ([Thakkar et al., 1984](#); [García et al., 1991](#)). Por otro lado, los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  pueden estar actuando neutralizando las cargas en las membranas que deben interaccionar, permitiendo el acercamiento entre las mismas y favoreciendo la fusión o podrían actuar como un puente iónico ([Yanagimachi, 1994](#)).

Bajo condiciones *in vitro*, los espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo son capaces de acumular  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que los espermatozoides recién eyaculados no, lo cual sugiere que el contacto con el plasma seminal inhibe la capacidad de las células para transportar  $\text{Ca}^{2+}$  ([Coronel y Lardy., 1987](#)). Un inhibidor del transporte de este catión divalente llamado caltrina, se ha aislado del plasma seminal del toro; esta proteína funciona aparentemente modulando la actividad del antipuerto  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  ([Chavarría et al., 1996](#)).

En general se han distinguido tres eventos que requieren la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y que preceden a la RA:

- 1.- La hidrólisis de los polifosfoinosítidos por la fosfolipasa C, enzima que requiere la presencia de concentraciones pequeñas de  $\text{Ca}^{2+}$  y que es inhibida por  $\text{Mg}^{+2}$ .
- 2.- La producción de diacil glicerol (DAG), que induce la activación de la fosfolipasa A2 (PLA2).

3.- La actividad de la PLA2 libera a los ácidos grasos de la posición 2 de la fosfatidilcolina, generando la formación de lisofosfolípidos, que tienen actividad fusogénica.

### **Participación de elementos del citoesqueleto durante la capacitación y la reacción acrosomal**

En células espermatozoides, los filamentos de actina han sido descritos primariamente en el espacio subacrosomal entre el núcleo y el desarrollo acrosomal de las espermátides de ciertas especies de mamíferos (*Vogl, 1989*). En espermatozoides maduros sin embargo, la estructura y localización de los filamentos de actina aún no están del todo claros (*Howes et al, 2001*). En espermatozoides humanos las regiones reportadas que contienen actina incluyen al espacio acrosomal, ecuatorial, región post-acrosomal y la cola (*Clarke et al., 1982, Virtanen et al., 1984, Ochs y Wolf, 1985*). La presencia de actina en la cola puede ser importante para la regulación de la motilidad espermática y su presencia en la cabeza sugiere una posible participación durante la RA. La localización de actina en la región acrosomal de algunas especies de mamíferos incluyendo hámster, verraco, humano, toro, conejo y cerdo (*Moreno – Fierros et al., 1992, Yagi y Paranko, 1995*) sugieren un posible papel en la capacitación espermática y en la RA.

La polimerización de actina es necesaria para la incorporación del espermatozoide dentro del citoplasma del óvulo (*Sánchez-Gutiérrez et al., 2002*) y para la descondensación del núcleo espermático (*Kumakiri et al., 2003*). *Lin et al., 2002*, reportaron que la polimerización de actina es importante para iniciar la movilidad espermática durante la maduración post- testicular. La polimerización de actina y la capacidad fertilizante de espermatozoides de verraco (*Castellani-Ceresa et al., 1993*) y ratón (*Brener et al., 2003*), pueden ser inhibidas por citocalasina D un inhibidor de los filamentos de actina.

En bovinos, la polimerización de actina y la fosforilación de proteínas en tirosina durante la capacitación espermática, son dos procesos que no ocurren en

ausencia de  $\text{NaHCO}_3$  y ambos dependen de las actividades de PKA y de tirosina cinasas (*Brener et al., 2003, Rivlin et al., 2004*). Estos datos sugieren que la polimerización de actina y la fosforilación de tirosinas son procesos relacionados que ocurren durante la capacitación espermática. Estos dos procesos son necesarios pero insuficientes para llevar a cabo la capacitación espermática (*Brener et al., 2003, Cohen et al., 2004*).

Se ha sugerido que la polimerización de actina que ocurre durante la capacitación, depende de tirosina cinasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , los cuales conducen a la fosforilación de tirosinas en proteínas espermáticas de 80 kDa y 85 kDa (*Chen et al., 2000*). Durante la capacitación la fosfolipasa D (PLD) está involucrada en la polimerización de actina del espermatozoide bovino (*Cohen et al., 2004*). Los requerimientos de la actividad de PLD para la formación de filamentos de actina se fundamenta en lo siguiente: primero, la polimerización de actina es significativamente disminuida por inhibidores de PLD (butan-1-ol y ceramida C2); segundo, PLD exógeno o ácido fosfatídico (PA) estimulan la polimerización de actina, la cual no es afectada por butan-1-ol y finalmente previo a la formación de filamentos de actina la actividad de PLD se ve aumentada durante la capacitación, (*Cohen et al., 2004*). Relativamente rápido (10-20 minutos), la activación de la PLD y la polimerización de actina son inducidas por la activación de PKA o PKC y se ven completamente bloqueadas por la adición de butan-1-ol, indicativo de estos procesos mediados por PLD (*Breitbart et al. 1995, Cohen et al., 2004*).

Por otra parte la activación de la PKC durante la capacitación espermática bovina causa un incremento rápido en la polimerización de actina, la cual es seguida por una rápida despolimerización de la misma (*Cohen et al., 2004*), esto último es probablemente debido al incremento en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) (*Spungin y Breitbart, 1996, Brener et al., 2003*). Una mayor formación de filamentos de actina es necesaria al final de la capacitación (*Brener et al., 2003*), y lo cual no puede ser alcanzado cuando la PKC está activada (*Cohen et al., 2004*), y por lo tanto la capacitación tampoco puede ser obtenida. Bajo condiciones no fisiológicas, la activación de PKA o PKC puede independientemente causar la

activación de PLD, principalmente en la polimerización de actina, no obstante, bajo condiciones fisiológicas, la vía de PKA es obligatoria para la polimerización de actina y la capacitación, mientras que la vía de PKC es importante para la RA ([Cohen et al., 2004](#), [Chen et al., 2000](#), [Cohen et al., 2004](#)).

### **Interacción del espermatozoide con el ovocito**

Entre los componentes del espermatozoide que se han postulado como responsables de la adhesión con la ZP está la enzima glicosil transferasa. En el espermatozoide de ratón esta es una proteína de la MP, con un peso molecular de 55 kDa, localizada en la superficie de la región acrosomal ([Guzmán et al., 1992](#)).

En la superficie del espermatozoide de rata (*Rattus rattus*) se ha reportado otra proteína con peso molecular de 49-54 kDa con características de lectina que reconoce y une galactosa, relacionada antigénicamente con el receptor para acilglicoproteínas séricas del hígado de rata. En el conejo (*Oryctolagus cuniculus*) otra proteína de 14 kDa (autoantígeno de espermatozoide de conejo, RSA-I) tiene la propiedad de unirse a una glicoproteína de 87 kDa de la ZP del ovocito; la unión es inhibida por fucoídina y dextrán sulfato ([Dudenhausem y Talbot, 1982](#)).

En el espermatozoide de conejo la acrosina se encuentra presente en el acrosoma intacto; pero después de la inducción de la RA, por la ZP, un porcentaje de ella permanece asociada a las regiones ecuatorial, postacrosomal y pieza media del espermatozoide. Según la hipótesis de [Richardson et al., \(1991\)](#), en el espermatozoide humano la unión entre ciertas proteínas de la superficie del espermatozoide (pro-acrosina) y componentes de la ZP (ZP<sub>3</sub>), trae como consecuencia la activación de las enzimas proteolíticas (conversión de pro-acrosina en acrosina); con la consiguiente hidrólisis y liberando de los componentes de la ZP previamente unidos para establecer otras uniones. La continuidad de este proceso le permite al espermatozoide penetrar la ZP ([Guzmán et al., 1992](#)).

En el hámster se ha identificado la P26, una proteína que se adhiere a la membrana del espermatozoide durante el tránsito epididimario, cubriendo la capa acrosomal ([Robitaille et al., 1991](#)), zona que ha sido definida como la región subcelular involucrada en la unión del espermatozoide con la ZP ([Bérubé y Sullivan, 1994](#)). La P26 muestra una afinidad especie-específica por glicoproteínas y homólogos de la ZP, por lo que se cree participa en la unión del espermatozoide a la ZP ([Parent et al., 1999](#)). En humanos el homólogo de P26 es P34H y se ha observado que su cantidad de esta proteína varía en los espermatozoides provenientes de hombres fértiles e infértiles, proporcionando una evidencia firme de que esta proteína podría ser un indicador de fertilidad masculina ([Parent et al., 1999](#)).

#### **V.- Planteamiento del problema**

El espermatozoide del mamífero es capaz de fertilizar exitosamente al óvulo sólo después de haber experimentado la maduración epididimaria, la capacitación y la RA. Durante la capacitación en el espermatozoide se presentan una serie de cambios entre los que destacan, la reorganización de proteínas, carbohidratos, y lípidos de la MP así como cambios en el metabolismo de lípidos y la salida de colesterol de la misma, que ocasionan entre otras cosas alteraciones en la arquitectura de los fosfolípidos de la membrana ([Gadella y Harrison., 2000](#), [Gadella, 2002](#)). En un estudio reciente [Ávalos-Rodríguez et al., \(2004\)](#) demostraron que durante la inducción de la capacitación y la RA, *in vitro*, ocurre la pérdida de la asimetría fosfolípida de la MP, además reportaron diferencias topológicas de esta asimetría. Sin embargo hasta el momento se desconoce si esta pérdida de la asimetría de los fosfolípidos de la MP del espermatozoide es un evento dependiente de enzimas translocadoras de fosfolípidos, por lo cual en este trabajo nos propusimos conocer el efecto que tiene el NEM, un inhibidor de las translocasas, sobre la inducción de la RA de los espermatozoides obtenidos de cola de epidídimo de conejo.

## **V.- Hipótesis**

- La pérdida de la asimetría fosfolipídica de la membrana plasmática durante la capacitación y la reacción acrosomal del espermatozoide del conejo es mediada por enzimas translocadoras.

## **VI.- Objetivo general**

- Conocer si el N-Etilmaleimida impide la translocación de la fosfatidilserina de la membrana plasmática y con ello la reacción acrosomal en los espermatozoides de conejo.

## **VII.- Objetivos particulares**

- Conocer si el N-Etilmaleimida inhibe la reacción acrosomal inducida por la progesterona, en los espermatozoides de conejos.
  
- Conocer si durante la reacción acrosomal inducida con progesterona el N-Etilmaleimida inhibe la asimetría fosfolipídica de la membrana plasmática del espermatozoide.

## V.- Planteamiento del problema

El espermatozoide del mamífero es capaz de fertilizar exitosamente al óvulo sólo después de haber experimentado la maduración epididimaria, la capacitación y la RA. Durante la capacitación en el espermatozoide se presentan una serie de cambios entre los que destacan, la reorganización de proteínas, carbohidratos, y lípidos de la MP así como cambios en el metabolismo de lípidos y la salida de colesterol de la misma, que ocasionan entre otras cosas alteraciones en la arquitectura de los fosfolípidos de la membrana ([Gadella y Harrison., 2000](#), [Gadella, 2002](#)). En un estudio reciente [Ávalos-Rodríguez et al., \(2004\)](#) demostraron que durante la inducción de la capacitación y la RA, *in vitro*, ocurre la pérdida de la asimetría fosfolípida de la MP, además reportaron diferencias topológicas de esta asimetría. Sin embargo hasta el momento se desconoce si esta pérdida de la asimetría de los fosfolípidos de la MP del espermatozoide es un evento dependiente de enzimas translocadoras de fosfolípidos, por lo cual en este trabajo nos propusimos conocer el efecto que tiene el NEM, un inhibidor de las translocasas, sobre la inducción de la RA de los espermatozoides obtenidos de cola de epidídimo de conejo.

## **VIII.- Material y métodos**

### **Material biológico**

Se utilizaron 20 conejos machos de la raza Nueva Zelanda blancos, sexualmente maduros y con fertilidad probada. Los animales permanecieron en el bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, disponiendo de alimento y agua *ad libitum*, temperatura controlada de 18°C y ciclos de luz / oscuridad de 12 /12 horas.

### **Obtención de muestras**

Para obtener los espermatozoides de la cola del epidídimo, los conejos se sacrificaron por dislocación cervical. Se desangraron cortando la vena yugular, se realizó la disección de los testículos y posteriormente se ligaron las venas y el conducto del epidídimo con hilo de algodón, se efectuó la perfusión con solución salina fisiológica NaCl 0.154 mmoles a 37°C. Posteriormente se separó el epidídimo del testículo, se ligó con hilo de algodón entre la región de la pieza media y la cola del epidídimo. Los espermatozoides se obtuvieron por perfusión de la región caudal del epidídimo, para ello, se inyectaron 3 ml de medio Brackett (KCl 4.02 mM, NaCl 112.00 mM, NaHCO<sub>3</sub> 37.00 mM, ácido pirúvico 1.25 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.25 mM, glucosa 13.90 mM, fosfato de sodio 0.83 mM, cloruro de magnesio 0.52 mM, 3.0 g/l de albúmina de suero bovino a pH 7.6) ([Brackett y Oliphant., 1975](#)) a 37 °C a través del conducto deferente, se hicieron pequeñas incisiones en la cola del epidídimo con una aguja calibre 21G y se colectó la suspensión de espermatozoides en un tubo cónico de polipropileno graduado, la muestra se centrifugó a 500 g durante 5 minutos a 37°C y se resuspendió en 1.5 ml del mismo medio.

### **Procesamiento de las muestras**

Se realizó un espermiograma para verificar la viabilidad de las muestras, el cual consistió en valorar el movimiento progresivo mediante microscopía óptica (objetivo 40 X); estimar el porcentaje de espermatozoides vivos, mediante la técnica de tinción supravital eosina-nigrosina ([Swanson et al.,](#)

1951, Yunes *et al.*, 2000), con esta tinción los espermatozoides muertos adquieren una coloración rojiza, mientras que los vivos no se tiñen, la concentración espermática se calculó contando los espermatozoides en un hemocitómetro estándar (cámara de Neubauer) (Freshman, 2002). Se eliminaron las muestras contaminadas con sangre, así como las que no presentaron mínimo 80% de espermatozoides vivos y movimientos progresivos calificados como buenos y excelentes (Belsey *et al.*, 1980).

### **Inducción de la capacitación espermática**

Los espermatozoides recuperados se incubaron en medio Brackett durante seis horas a 37 °C con agitación suave y constante en tubos cónicos de polipropileno bajo una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>/aire y con una humedad relativa del 80%. Al finalizar el tiempo de la capacitación se tomaron dos alícuotas, una de 25 µl que se utilizó para determinar la viabilidad usando el método de eosina / nigrosina y la movilidad por observación directa al microscopio (40 X) y otra de 50 µl para valorar el porcentaje de espermatozoides capacitados por el método de clorhidrato de tetraciclina (CTC) (Green *et al.*, 1994).

### **Evaluación de la capacitación mediante clorhidrato de tetraciclina (CTC)** (García-Macedo *et al.*, 2000)

Actualmente se han descrito numerosas técnicas para determinar cuándo un espermatozoide sufre la capacitación y/o RA, la mayoría se basan en los cambios físico-químicos que ocurren durante estos dos procesos, tal es el caso del uso del antibiótico fluorescente CTC, con el cual se puede detectar la capacitación y la RA. Sin embargo, para discernir entre ambos procesos, la CTC se utilizó solo para detectar la capacitación y para RA se utilizó la tinción con azul brillante de Coomassie G-250 (CBB), (Gafó y Garde., 1994). La CTC es un compuesto fluorescente, quelante de cationes divalentes, en el caso de los espermatozoides, la intensidad de la fluorescencia depende de la presencia y localización de los niveles de Ca<sup>2+</sup>. Estos patrones de fluorescencia se usaron para evaluar la capacitación de los espermatozoides,

el 70+/-5% de los espermatozoides habían alcanzado la capacitación a las seis horas de incubación en medio Brackett.

Para la realización de la técnica después de seis horas de incubación bajo condiciones capacitantes, una alícuota de 50  $\mu$ l de la suspensión de espermatozoides se mezcló con 50  $\mu$ l de una solución de CTC (CTC 750  $\mu$ moles, NaCl 130 mmoles, cisteína 5 mmoles, Tris-Cl 20 mmoles, pH 7.8), después de 10 minutos de incubación, se adicionaron 10  $\mu$ l de una solución de paraformaldehído al 12% en Tris 0.5 moles, pH 7.4 (*Green et al., 1994*), se colocaron 10  $\mu$ l de esta mezcla sobre un porta objetos a 37°C, se mezclaron con 10  $\mu$ l de glicerol, para evitar la disminución de la fluorescencia por fotoblanqueo (*Köhn et al., 1997*) y se observaron inmediatamente en un microscopio con epifluorescencia Zeiss con filtro 2FI (405 nm de excitación, 460 nm de emisión y filtros de barrera de 510 nm). Se contaron 200 espermatozoides en cada una de las condiciones experimentales y se clasificaron de acuerdo al patrón de fluorescencia que se observó en la región de la cabeza.

1.-Toda la superficie del espermatozoide teñida de manera uniforme con CTC indica espermatozoides no capacitados.

2.-Una ligera tinción en la superficie postacrosomal del espermatozoide indica que están capacitados.

3.-Espermatozoides con ligera tinción en la región apical de la cabeza indica espermatozoides reaccionados (*Das Gupta et al., 1994*).

### **Inducción de la reacción acrosomal**

Para la inducción de la RA con P<sub>4</sub> de las muestras previamente capacitadas se tomaron ocho alícuotas de 300 µl cada una y se les dio el siguiente tratamiento:

- a) Testigo incubado en medio Brackett
- b) N-etilmaleimida NEM (5mM)
- c) P<sub>4</sub> (3 mM) + NEM (5mM )
- d) P<sub>4</sub> (3 mM)

En un primer experimento (experimento piloto) se adicionó el NEM sin ninguna incubación previa y en los siguientes se realizó una preincubación de 30 minutos con este inhibidor antes de adicionar la P<sub>4</sub>, posteriormente se continuó la incubación a 15, 30, 45 y 60 minutos a 37°C bajo una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>/aire y una humedad relativa del 80%, cabe mencionar que el tiempo cero fue al momento de aplicar el tratamiento. En cada tiempo se determinó el porcentaje de espermatozoides que presentaron RA utilizando el método de CBB ([Miller et al., 1993](#)).

### **Evaluación de la reacción acrosomal por el método de CBB**

Se tomó una alícuota de 5 µl de cada tratamiento y se preparó un frotis en un portaobjetos previamente tratado con poli-lisina, y se secaron al aire. Los frotis se tiñeron por inmersión durante dos horas en una solución de CBB G-250 preparada en 50% de metanol y 10% de ácido acético. Los frotis teñidos se lavaron con agua destilada, se observaron y contaron en un microscopio Olympus Optical CO., LTD. Modelo CH30RF100 con el objetivo 40 X. Se contaron 200 espermatozoides por cada tratamiento. En todos los casos, los espermatozoides se clasificaron de acuerdo al patrón de tinción de sus acrosomas y se calculó el porcentaje de espermatozoides capacitados o con RA; la falta de tinción azul en el dominio acrosomal, es característico de espermatozoides con RA, la tinción homogénea indica espermatozoides no reaccionados con MP intacta ([Ávalos-Rodríguez et al., 2004](#)).

### **Presencia de fosfatidilserina en los espermatozoides**

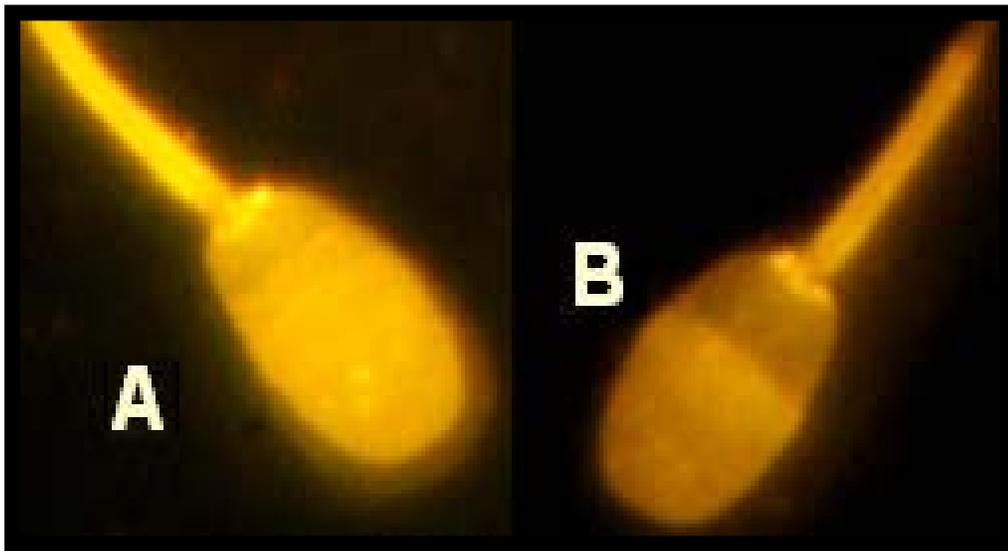
Con el propósito de verificar que los espermatozoides reaccionados pierden la asimetría de sus membranas durante la RA y por lo tanto presentan PS en la cara externa de la MP, se tomaron tres alícuotas: una de espermatozoides sin capacitar, otra de espermatozoides capacitados por la incubación durante 30 min con P<sub>4</sub> y la tercera de espermatozoides capacitados con P<sub>4</sub> más NEM. Las alícuotas se incubaron con anexina-V conjugada con el fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (Anexina-V-FITC), la cual se une de manera específica a la PS. A 20 µl de la muestra se le adicionó 20 µl de Anexina-V-FITC (10 µg/ml en solución amortiguadora, Hepes/NaOH 10 mM, pH 7.4, NaCl 140 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM). Las muestras se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad, posteriormente se realizaron frotis y se observaron en un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axiovert 100M, usando 405 nm de excitación y 460 nm de emisión para detectar Anexina-V FITC. Las imágenes fueron analizadas posteriormente haciendo uso del software LSM 5 Image Browser para microscopía de fluorescencia.

### **Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico, los datos se analizaron con ANOVA y prueba de Tukey, se utilizó el paquete Sigma Stat v2.0 (Sigma-Aldrich Co., San Louis, Missouri, USA). Se compararon las medias del grupo tratado solo con P<sub>4</sub> contra las medias del grupo tratado con P<sub>4</sub> más NEM y el valor de significancia fue ( $p < 0.05$ ).

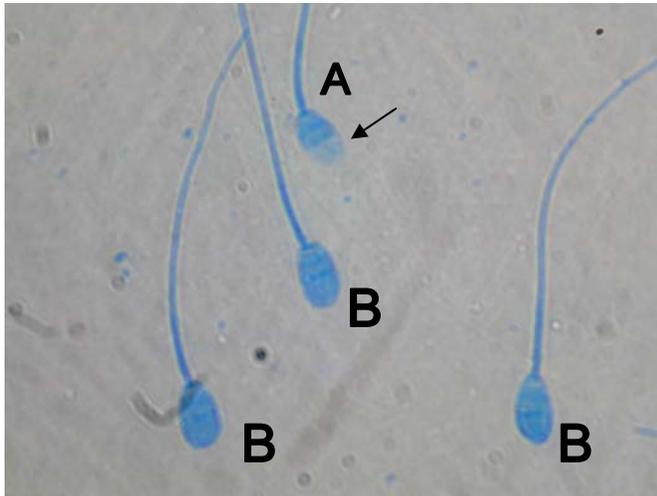
## X.-Resultados

Al término de seis horas de incubación en el medio Brackett, se evaluaron las muestras mediante microscopía de fluorescencia, y se encontró que el 70+/-5% de los espermatozoides habían alcanzado la capacitación, estos adquieren un patrón clásico de fluorescencia (**figura 4**).



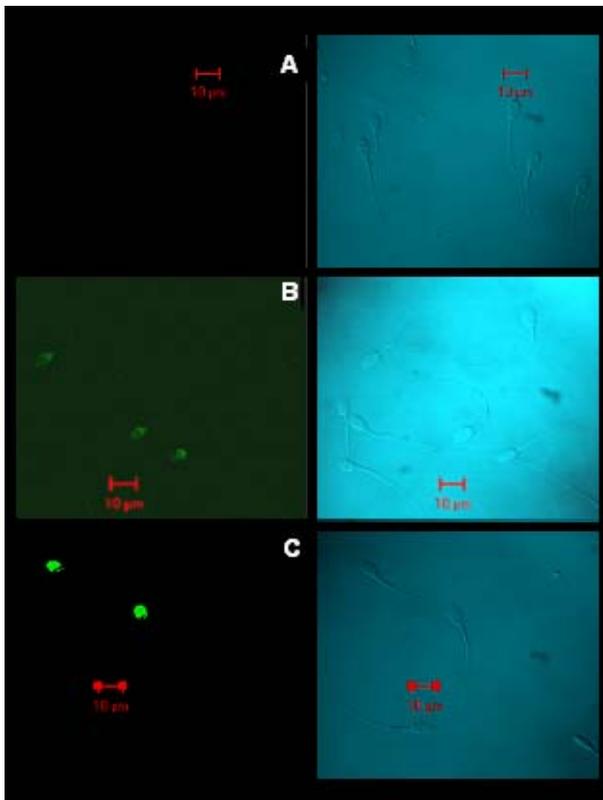
**Figura 4** Tinción de espermatozoides de conejo con clorhidrato de tetraciclina. Esta foto muestra el patrón de fluorescencia de un espermatozoide sin capacitar (A), fluorescencia homogénea en todo el espermatozoide y otro capacitado (B) disminución de la fluorescencia en la región acrosomal y la presencia de una banda fluorescente brillante en la región ecuatorial.

En los espermatozoides previamente capacitados, al ponerlos en contacto con la P<sub>4</sub>, se producen cambios físico químicos, se pierde la asimetría de su MP y se produce la RA (**figura 5**).



**Figura 5** Tinción de espermatozoides con azul brillante de Coomassie. Espermatozoides con reacción acrosomal, la falta de tinción azul en el dominio acrosomal es característico (A), (B) espermatozoides no reaccionados la tinción homogénea es indicativo de una membrana plasmática intacta.

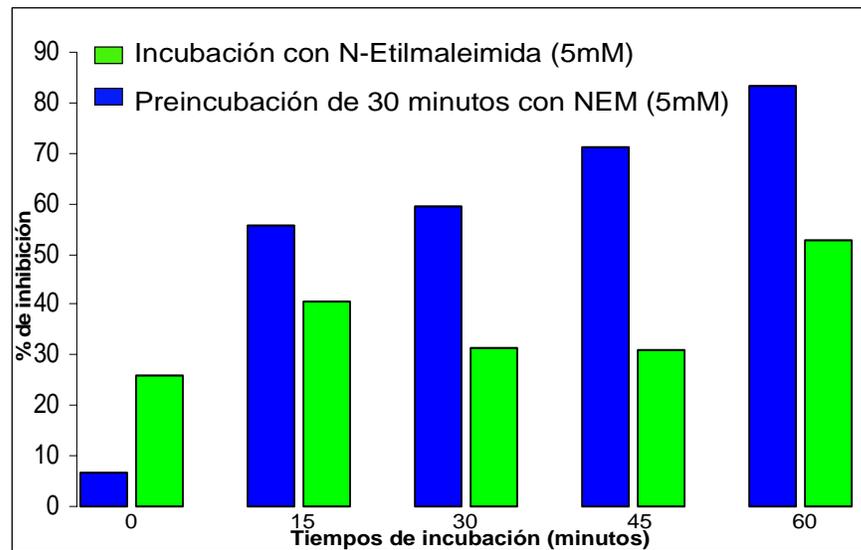
En este trabajo se hizo evidente la presencia de PS en la cara externa de la MP de la célula espermática, gracias a la unión de anexina-V, marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (**figura 6**). La anexina-V es una proteína que pertenece a la familia de las unidoras de fosfolípidos, se une en forma exclusiva a PS bajo condiciones adecuadas de  $\text{Ca}^{2+}$  (*Glander y Schaller, 1999*). La anexina-V se ha utilizado para detectar la pérdida de la asimetría membranal en diferentes sistemas celulares (*Koopman et al., 1994, Vermes et al., 1995, Homburg et al., 1995*).



**Figura 6** Microscopía de fluorescencia de los espermatozoides marcados con anexina V-FITC. Los espermatozoides no capacitados y sin RA (6A), no presentan fluorescencia. En la figura (6B) se observa la fluorescencia presentada por los espermatozoides capacitados y tratados con  $\text{P}_4$  más N-etilmaleimida por 30 minutos. En la figura (6C) la fluorescencia presentada por los espermatozoides tratados con  $\text{P}_4$ , aquí a nivel del dominio acrosomal.

En la **tabla 2** se puede observar, que el porcentaje de espermatozoides con RA se vio incrementado significativamente con respecto al tiempo de incubación en todos los tratamientos realizados, el efecto del tratamiento también influyó de manera significativa sobre el porcentaje de espermatozoides reaccionados. Cabe señalar que el porcentaje de espermatozoides con RA que se observó en el grupo testigo es lo que se considera como RA espontánea. En el grupo testigo y el tratado con NEM se observaron los porcentajes más bajos de RA para todos los tiempos de estudio, no mostrando diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre ambos grupos. Además los datos de este cuadro muestran claramente el efecto inductor de RA que tiene la  $P_4$ , el cual resulta evidente a partir de los 15 minutos de incubación, mintiendo siempre los porcentajes mayores y con respecto a todos los otros grupos, con diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0.05$ ). En el grupo tratado con  $P_4$  y NEM, previa incubación con NEM, se puede ver claramente que NEM tuvo un efecto inhibitorio muy claro en la RA inducida por  $P_4$  ya que en todos los casos a partir de los 15 minutos de iniciar el tratamiento, este grupo mostró cifras más bajas de espermatozoides reaccionados, lo cual fue estadísticamente significativo ( $P > 0.05$ ), al compararlo con el grupo tratado solo con  $P_4$  (**gráfica 1**). En estos dos últimos también fue muy claro el efecto del tiempo de incubación. A partir de los 15 minutos en ambos grupos hubo un aumento significativo ( $P > 0.05$ ) de espermatozoides con RA, de tal manera que a los 60 minutos se encontraron los porcentajes mas altos de espermatozoides con RA. En el experimento piloto (**tabla 1**) sin una preincubación de los espermatozoides con el inhibidor (NEM), se encontró que el mayor porcentaje de inhibición de la RA fue del 52.8% a los 60 minutos de incubación, en cambio, cuando se realizó una incubación previa con NEM, el mayor porcentaje de inhibición de la RA fue del 83.10% a los 60 minutos de incubación. Este cálculo se realizó tomando como el 100% el porcentaje de RA del tratamiento solo con  $P_4$ , al cual se le resto el porcentaje del tratamiento de  $P_4$  con NEM.

## Porcentaje de inhibición de la reacción acrosomal en espermatozoides incubados con NEM



**Grafica 1** En esta gráfica se observa como la preincubación de 30 minutos con el inhibidor de enzimas translocasas (NEM), tiene un mayor efecto en la inhibición de la RA que cuando se aplica sin dicha preincubación.

**Tabla 1** Porcentaje de RA en los espermatozoides capacitados en presencia de progesterona con y sin NEM

Tratamiento	0 min.	15 min.	30 min.	45 min.	60 min.
Testigo	1.8±0.66 <sup>*a</sup>	3.4±1.07 <sup>**a</sup>	7.7±1.41 <sup>***a</sup>	8.4±1.07 <sup>***a</sup>	13±1.24 <sup>**** a</sup>
N-etilmaleimida (5 mM)	1.4±0.51 <sup>*a</sup>	3.3±0.94 <sup>**a</sup>	7.7±1.05 <sup>**a</sup>	8.2±1.13 <sup>**c</sup>	12.5±1.26 <sup>***a</sup>
Progesterona (3 mM) y N-etilmaleimida (5 mM)	2±0.47 <sup>*ab</sup>	7.8±1.75 <sup>**b</sup>	12.8±1.31 <sup>***b</sup>	18±2.40 <sup>****b</sup>	25.3±2.49 <sup>***** b</sup>
Progesterona (3 mM)	2.7±0.94 <sup>*ab</sup>	13.1±1.52 <sup>**c</sup>	18.6±1.26 <sup>***c</sup>	26±2.70 <sup>****a</sup>	53.6±3.68 <sup>***** c</sup>

Los datos en la tabla, son el promedio y desviación estándar de 10 experimentos. Diferentes letras indican diferencia estadística ( $p < 0.05$ ), entre datos de la misma columna.

Diferente número de asterisco indica diferencia estadística ( $p < 0.05$ ), entre datos del mismo renglón. Prueba ANOVA y Tukey.

**Tabla 2.** Porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal, preincubadas durante 30 minutos con y sin N-Etilmaleimida

Tratamiento	0 min.	15 min.	30 min.	45 min.	60 min.
Testigo	1.42±0.53 <sup>*a</sup>	3.57±0.97 <sup>**a</sup>	5.71±1.25 <sup>***a</sup>	7.42±1.39 <sup>****a</sup>	8.28±1.25 <sup>****a</sup>
N-Etilmaleimida (5 mM)	1.71±0.95 <sup>*a</sup>	3.85±0.69 <sup>**ab</sup>	6.14±1.34 <sup>***ab</sup>	7.28±1.97 <sup>***a</sup>	8.57±1.71 <sup>***a</sup>
Progesterona (3mM) y N-Etilmaleimida (5 mM)	2.00±0.57 <sup>*a</sup>	5.57±0.97 <sup>**b</sup>	7.57±0.97 <sup>***b</sup>	8.00±1.91 <sup>***a</sup>	8.85±1.77 <sup>***a</sup>
Progesterona (3mM)	2.14±0.69 <sup>*a</sup>	12.57±1.98 <sup>**c</sup>	18.71±3.25 <sup>***c</sup>	27.85±2.54 <sup>****b</sup>	52.42±6.55 <sup>*****b</sup>

Los datos en la tabla, son el promedio y desviación estándar de 10 experimentos. Diferentes letras indican diferencia estadística ( $p < 0.05$ ), entre datos de la misma columna.

Diferente número de asterisco indica diferencia estadística ( $p < 0.05$ ), entre datos del mismo renglón. Prueba ANOVA y Tukey.

## **XI.- Discusión**

Para que un espermatozoide alcance la capacidad fertilizante requiere de procesos fisiológicos como, la maduración epididimaria, la capacitación y la RA. El primero ocurre en el epidídimo durante su trayecto por la cabeza, cuerpo y cola de dicho órgano, durante este proceso los principales cambios que sufre el espermatozoide son: adquirir su forma definitiva, la capacidad para moverse y la habilidad para interactuar con el ovocito y se vuelven potencialmente fértiles ([Yanagimachi, 1994](#)). Sin embargo los espermatozoides obtenidos de la región caudal del epidídimo no tienen componentes adquiridos del plasma seminal, que pudieran alterar o retrasar su capacitación ([Yanagimachi, 1994](#)). Estudios recientes confieren ventaja a los espermatozoides de epidídimo sobre los eyaculados en términos del tiempo para alcanzar la RA ([García-Macedo et al., 2001](#) y [Harkema et al., 2004](#)). En este trabajo se utilizaron espermatozoides de cola de epidídimo, con la finalidad de evaluar el efecto de un inhibidor de translocasas de fosfolípidos sobre la asimetría de la membrana, durante la capacitación *in vitro* de las células ([Marti et al., 2006](#)).

Una vez madurados los espermatozoides, estos son eyaculados y depositados en el tracto reproductor femenino donde experimentarán el proceso de capacitación, el cual se caracteriza por una serie de cambios a nivel de la MP como son: remoción gradual o alteración de glicoproteínas, disminución del contenido de colesterol y cambios en la distribución y composición de fosfolípidos de la membrana ([Yanagimachi, 1994](#), [Muller et al., 1994](#), [Nolan et al., 1995](#), [Gadella et al., 1999](#), [Gadella et al., 2001](#), [Rathi et al., 2003](#), [Daleke, 2003](#)). Solo los espermatozoides capacitados son capaces de entrar en contacto con la ZP, lo cual se desencadena la fusión de la MP con la membrana acrosomal externa, seguida de la formación de poros y vesículas, que permiten la salida del contenido acrosomal y la penetración del espermatozoide en el ovocito, este evento fisiológico recibe el nombre de RA ([Yanagimachi, 1994](#)). En un estudio reciente [Ávalos-Rodríguez et al., \(2004\)](#) reportaron que durante la capacitación y la RA, inducida con P<sub>4</sub>, los

espermatozoides de conejo pierden la asimetría fosfolípídica de la MP. Esta pérdida en la asimetría puede ocurrir como consecuencia de la intervención de enzimas translocadoras de fosfolípidos y probablemente la pérdida de la asimetría fosfolípídica es un requisito para que se realice la RA.

Los lípidos estructurales de la bicapa de las membranas biológicas se encuentran en equilibrio, gracias a la acción de diferentes enzimas denominadas translocasas, de las cuales se conocen tres tipos: escramblasas, dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , no son selectivas y actúan de manera aleatoria; flopasas, que transportan fosfolípidos aniónicos de la cara interna hacia la cara externa de la MP y las flopapasas, que actúan de manera inversa a las flopasas, ambas son dependientes de ATP y  $\text{Mg}^{2+}$  (*Devaux, 2000, Daleke, 2003, Di Vittorio et al., 2005*). Se sabe que todos los fosfolípidos difunden pasivamente a través de la bicapa, cuando uno de ellos, por ejemplo la PS o PE cambian de posición, éstos son transportados activamente de la cara externa de la membrana hacia la cara interna por la acción de las enzimas translocasas (*Kuypers et al., 1996*). El efecto continuo de flip-flop trae como consecuencia la pérdida de la asimetría membranal, la cual juega un papel muy importante en la adhesión celular (*Schlegel et al., 1985, Verhoven et al., 1992*) y en procesos de fusión de membranas (*Bailey y Cullis, 1994*), incluyendo la exocitosis celular (*Bogdanov et al., 1993, Müller et al., 1996*). Se sabe que algunos componentes del medio capacitante, como son el  $\text{Ca}^{2+}$  (*Emiliozzi y Fenichel, 1997, Osheroff et al., 1999*); el  $\text{NaHCO}_3$  (*Gadella y Harrison, 2000*) e indirectamente la albúmina (*Langlais y Roberts, 1985, Iborra et al., 2000*) entre otros, participan de manera importante en la inducción de la translocación fosfolípídica en la MP, lo que produce cambios en la arquitectura del espermatozoide, necesarios para la fusión entre membranas.

El  $\text{Ca}^{2+}$  juega un papel muy importante en la adquisición de la capacidad fecundante de este gameto, también facilita la capacitación y la RA. Se sabe que el incremento en la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, produce una

distribución al azar de los fosfolípidos de la membrana (*Williamson et al, 1992*). El desorden que se produce ocasiona la pérdida de la asimetría de los fosfolípidos de la membrana y posteriormente la formación de vesículas. La relación entre vesiculación y translocación de fosfolípidos está apoyada por experimentos que mostraron brotes espontáneos y vesiculaciones en liposomas después de una inducción en la redistribución transmembranal de fosfolípidos (*Farge y Deveraux, 1992*). La  $P_4$  tiende a aumentar las concentraciones citosólicas de  $Ca^{2+}$  en el espermatozoide, vía PTK y PKC, lo que desencadena cambios membranales importantes (*Thomas y Meizel, 1988, Patrat et al., 2000, Rathi et al., 2003*). Los resultados que se reportan en este trabajo (**figura 6c**), muestran con claridad que durante el tiempo que pasa el espermatozoide en un medio capacitante, como es el medio Brackett, el cual contiene elementos que se han reportado como inductores de la pérdida de la asimetría fosfolipídica de la MP el  $Ca^{2+}$  (*Emiliozzi y Fenichel, 1997; Osheroff et al., 1999*); el bicarbonato (*Gadella y Harrison, 2000*) e indirectamente la albúmina (*Langlais y Roberts, 1985; Iborra et al., 2000*) entre otros, más un inductor de RA como es la  $P_4$ , se llevan a cabo cambios membranales como la exposición de la PS necesaria para la fusión entre membranas, esto como consecuencia de un incremento en los movimientos de flip-flop, mientras en las muestras que presentaron el inhibidor de translocasas NEM (**figura 6b**), se observa una disminución en la proporción de espermatozoides con fluorescencia, como consecuencia de la inhibición de las enzimas translocasas necesarias para transportar los fosfolípidos de una lámina a otra, mientras que en la figura 5a se observa una ausencia de fluorescencia en espermatozoides sin capacitar y sin reacción acrosomal, lo que seguramente se trata de espermatozoides con una membrana completamente asimétrica, que no se ha exteriorizado la PS.

La exposición de PS es detectada, por la afinidad que tiene la anexina-V por este fosfolípido. La anexina-V-FITC es una proteína que pertenece a la familia de proteínas unidoras de fosfolípidos y se une solamente a PS bajo condiciones especiales de  $Ca^{2+}$ . La anexina-V-FITC es usada para detectar la

pérdida de la asimetría membranal en diferentes sistemas celulares ([Koopman et al., 1994](#); [Vermes et al., 1995](#); [Homburg et al., 1995](#)). Lo que resulta interesante de las imágenes que se presentan en la **figura 6**, es que la P<sub>4</sub> favorece un patrón de fluorescencia característico, la mayor cantidad de uniones de anexina-V-FITC ocurren en el límite entre la región acrosomal y post-acrosomal, como lo reportó [Avalos-Rodríguez et al., \(2004\)](#), lo que puede ser un punto de acumulación de efectos que preparan al espermatozoide para su fusión con el ovocito.

Los resultados de este trabajo evidencian que la P<sub>4</sub> induce la presencia de PS en la cara externa de la membrana de los espermatozoides (**figura 6**). La estimulación hacia la capacitación espermática y la subsiguiente RA con P<sub>4</sub> ha sido demostrada en varias especies animales ([Breitbart y Spungin, 1997](#), [Patrat et al., 2000](#), [Gadella et al., 2001](#), [Kirkman-Brown et al., 2002](#), [Thérien y Manjunath, 2003](#), [Rathi et al., 2003](#)). Hasta el momento no se ha reportado ningún trabajo en el cual se haya inhibido la RA de células espermáticas a través de la vía de las aminofosfolípido translocasas, utilizando al NEM como inductor de la inhibición.

El NEM ha sido utilizado para modificar las propiedades químicas de las proteínas, y se asume que la reacción ocurre específicamente en el grupo tiol (SH) de los residuos de cisteína ([Smyth, 1964](#), [Riordan y Vallee., 1972](#), [Michaut et al., 2000](#); [Pastore et al., 2000](#); [Boon y Smith., 2001](#)). El 83.1% de inhibición que ocasionaron 5 mM de NEM sobre la RA de espermatozoides incubados con P<sub>4</sub>, permite afirmar que las enzimas translocadoras de fosfolípidos son en buena medida responsables de este importante evento en el espermatozoide. En un modelo alternativo de inhibición de la exocitosis acrosomal utilizando 3 mM de NEM en espermatozoides humanos, [Michaut et al., 2000](#) obtuvieron un 40% de inhibición, [Jackson y Modern, en 1990](#) estudiando la exocitosis de los gránulos corticales de huevos de erizo de mar, utilizando 5 mM de NEM lograron inhibir de manera total dicho proceso. [Rodríguez et al., 1994](#) utilizando de 3 a 5 mM de NEM lograron la

inactivación total del factor sensitivo a N-etilmaleimida (NSF), una proteína requerida en los eventos de fusión de múltiples sistemas celulares y que puede ser inhibida por el NEM (*Michaut et al., 2000*). El hecho de que el NEM no inhiba totalmente la RA, sugiere la existencia de otros mecanismos involucrados en este proceso que no pueden ser inhibidos por NEM, probablemente debido a que estas vías no presentan un grupo SH expuesto o que no son dependientes de energía y por lo tanto el NEM no tiene efecto sobre ellos. Un posible mecanismo que no puede ser inhibido con NEM es el de una proteína de membrana llamada Rab3 y sus isoformas A, B, C y D, que pertenecen a la familia de las GTPasas y promueven la exocitosis en diversos sistemas celulares (*Ohnishi et al., 1997, Gueppert y Sudhof, 1998, Conner y Wessel, 1998*). Rab3A es la mejor caracterizada y se activa bajo el estímulo del  $Ca^{2+}$ , estabiliza al NSF en las membranas celulares, como parte del mecanismo molecular que media la exocitosis acrosomal, el NSF en el espermatozoide humano se localiza en la región acrosomal y contribuye en el proceso de fusión de la MP con la acrosomal externa (*Michaut et al., 2000*).

Por otra parte nuestros resultados (**tabla 1 y grafica 1**) muestran claramente la importancia que tiene realizar una preincubación de la muestra de espermatozoides con el NEM para que éste pueda ejercer su efecto inhibitor de la RA (52.8% a los 60 minutos de incubación contra 83.10% a los 60 minutos, cuando se realiza una previa incubación con este), el comportamiento de las muestras en ambas gráficas es similar, la diferencia es marcada solamente en el grupo tratado con  $P_4$  más NEM. Es decir la preincubación podría ser necesaria para que el NEM se pueda unir a la mayoría de los grupos SH presentes y de esta manera inactivar a la enzima. La inhibición competitiva que ejerce el N-Etilmaleimida sobre el grupo SH de los aminoácidos cisteína y cistina de las translocasas, se ve favorecida de manera significativa con la incubación previa de 30 minutos, lo que significa que la temporalidad es necesaria para presentación de esta molécula a los radicales SH.

## **XII.- Conclusiones**

La incubación de las muestras de espermatozoides con N-etilmaleimida durante 30 minutos previos a la inducción de la reacción acrosomal con progesterona, aumentó de manera importante su capacidad para inhibir la reacción acrosomal.

Durante el proceso de reacción acrosomal inducido con progesterona en espermatozoides de conejo, existe pérdida de la asimetría fosfolipídica de la membrana plasmática.

Las enzimas translocasas, participan de manera importante en la pérdida de la asimetría de la membrana plasmática del espermatozoide durante la reacción acrosomal, ya que su inhibición fue capaz de impedir la reacción acrosomal hasta en un 83%.

El N-etilmaleimida es un agente químico efectivo en la inhibición de las enzimas translocadoras de fosfolípidos y de la reacción acrosomal del espermatozoide de conejo.

<b>Figura 1</b> Inhibición del grupo sulfhidrilo de una proteína por el N-Etilmaleimida.....	02
<b>Figura 2</b> Morfología de la célula espermática.....	07
<b>Figura 3</b> Modelo de mosaico fluido y asimetría de la membrana plasmática.....	13
<b>Figura 4</b> Tinción de espermatozoides de conejo con clorhidrato de tetraciclina.....	42
<b>Figura 5</b> Tinción de espermatozoides con azul brillante de Coomassie.....	43
<b>Figura 6</b> Microscopía de fluorescencia de los espermatozoides marcados con anexina V-FITC.....	43
<b>Grafica 1</b> Porcentaje de inhibición de la reacción acrosomal en espermatozoides incubados con NEM.....	45
<b>Tabla 1</b> Porcentaje de RA en los espermatozoides capacitados en presencia de progesterona con y sin NEM.....	46
<b>Tabla 2.</b> Porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal, preincubadas durante 30 minutos con y sin N-Etilmaleimida.....	47

### **XIII. - Literatura citada**

Ainsworth C. The secret life of sperm. *NATURE* 2005; 436: 770-771.

Aitken RJ, Paterson M, Fisher H. and Van Duim M. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *Journal of Cell Science* 1995; 108: 2017-2025.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K and Watson JD. *Biología molecular de la célula*. 3ª ed. Barcelona: Omega; 2002. Pp. 1083-1109.

Anzai K, Yoshioka Y and Kirino Y. Novel radioactive phospholipids probes as a tool for measurement of phospholipids translocation across biomembranes. *Biochem. Biophys. Acta* 1993;1151: 69-75.

Ashraf M, Peterson NR and Russell LD. Activity and localization of cation dependent ATPases on the plasma membrane of boar spermatozoa. *Biochem Biophys Res. Commun* 1982; 107:1273-1278.

Ávalos-Rodríguez A, Ortiz AR, Ortega CC, Vergara MO, Rosado AG and Rosales-Torres AM. Fluorometric study of rabbit sperm-head-membrane phospholipid asymmetry during capacitation and the acrosome reaction, using annexin-V-FITC. *Archives of Andrology* 2004; 50: 273 – 285.

Baldi E, Casano R, Falsetti C, Krausz C, Maggi M, and Forti G. Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa. *J. Androl* 1991; 12: 323-330.

Baldi E, Krausz C, Luconi M, Bonaccorsi L, Maggi M and Forti G. Actions of progesterone on human sperm: a model of non-genomic effects of steroids. *J. Steroid Biochem Mol. Biol.* 1995; 53:199-203.

Bedford JM. Mammalian fertilization misread? Sperm penetration of the eutherian zona pellucida is unlikely to be a lytic event. *Biol. Reprod.* 1998; 59:1275-1287.

Belsey MA, Moghissi KS, Aliason RJ, Paulsen C A, Gallegos A and Prasad MRN. Laboratory manual for the examination of human semen, cervical mucus interaction published by Press Concerní Singapore 1980.

Beleznay Z, Zachowski A, Devaux PF, Navazo MP and Ott P. ATP-dependent aminophospholipid translocation in erythrocyte vesicles: stoichiometry of transport. *Biochem.* 1993; 32: 3146-3152.

Benoff S. The role of cholesterol during capacitation of human spermatozoa. *Hum. Reprod* 1993; 8:2001-2008.

Bérubé B, Sullivan R. Inhibition of in vivo fertilization by active immunization of male hamster against a 26 kDa sperm glycoprotein. *Biol. Reprod* 1994; 51:1255-1263.

Bevers EM, Confurius P, Van Rijn J, Hemker C and Zwaal RF. Generation of prothrombin-converting activity and the exposure of phosphatidylserine. *Eur. J. Biochem.* 1982; 122, 429-436.

Bitbol M, Fellmann P, Zachowski A and Devaux PF. Ion regulation of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine outside-inside translocation in human erythrocytes. *Biochem. Biophys. Acta* 1987; 904: 268-282.

Blackmore PF, Beebe SJ, Danforth DR and Alexander N. Progesterone and 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone. Novel stimulators of calcium influx in human sperm. *J. Biol. Chem.* 1990; 265:1376-1380.

Blackmore PF, Neulen J, Lattlanzio F and Beebe SJ. Cell surface-binding sites for progesterone mediate calcium uptake in human sperm. *J. Biol. Chem.* 1991; 266:18655-18659.

Blackmore PF. Rapid non-genomic actions of progesterone stimulate Ca<sup>2+</sup> influx and the acrosome reaction in human sperm. *Cell signal* 1993; 5:531-538.

Boon JM and Smith BD. Chemical control of phospholipids distribution across bilayer membranes. *Med. Res. Rev.* 2002; 22: 251-281.

Boron WF. Intracellular pH regulation in epithelial cells. *Ann Rev Physiol* 1986; 43: 377-388.

Borst P, Zelcer N and Van Helvoort A. ABC transporters in lipid transport. *Biochem. Biophys. Acta* 2000; 1486: 128-144.

Borst P. and Elferink RO. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu. Rev. Biochem* 2002; 71: 537-592.

Bowman EJ, Siebers A and Altendorf K. Bafilomycins: A class of inhibitors of membrana ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 7972-7976.

Brackett BG and Oliphant G. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biology of Reproduction* 1975; 12: 260-274.

Breitbart H, Rubinstein S, Spungin B and Lax Y. Phosphorylation and cellular localization of signal transduction elements involved in sperm capacitation and acrosome reaction. *Biology of Reproduction* 1995; 52 (suppl. 1) 61.

Brener E, Rubinstein SG, Cohen K, Shternall J and Breitbart H. Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. *Biology of Reproduction* 2003; 68: 837-845.

Buckland AG and Wilton DC. Aionic phospholipids, interfacial binding and the regulation of cell functions. *Biochem. Biophys. Acta* 2000; 1483, 199-216.

Bütikofer P, Lin ZW, Chiu DTY and Kuypers FA. Transbilayer distribution and mobility of phosphatidylinositol in human red blood cells. *J. Biol. Chem.* 1990; 265: 16035-16038.

Cardona-Maya WD and Cadavid AP. Evaluación de la reacción acrosomal en espermatozoides humanos inducida por los monosacáridos manosa y N-acetilglucosamina. *Actas urológicas españolas* 2005; 29: 676-684.

Case GD, Vanderkooi JM and Scarpa A. Physical properties of biological membranes determined by the fluorescence of the calcium ionophore A23187. *Arch Biochem Biophys* 1974; 162:174-180.

Castellani- Ceresa L, Mattlioli M, Radaelli G, Barboni B and Brivio MF. Actin polymerization in boar spermatozoa: Fertilization is reduced with use cytochalasin D. *Molecular reproduction and development* 1993; 36: 203-211.

Chavarría ME, Mercado E, Rosado A and Reyes A. Simultaneous determinations of  $Ca^{2+}$ ,  $Na^{+}$ ,  $K^{+}$  and  $H^{+}$  in human spermatozoa incubated under capacitating conditions. *Mol. Androl* 1996; 8:153-169.

Cheng FP, Fazeli AR, Voorhout W, Bevers MM and Colenbrander B. Use of PNA (peanut agglutinin) to assess acrosomal status and the zona pellucida induced acrosome reaction in stallion spermatozoa. *J Androl* 1996; 17: 674–682.

Chen Y, Cann MJ, Litvin TN, Lourgenko V, Sinclair M L, Levin LR and Buck J. Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Sci* 2000; 289: 625-628.

Cohen G, Rubinstein S, Gur Y and Breitbart H. Crosstalk between protein kinase A and C regulates phospholipase D and F-actin formation during sperm capacitation. *Developmental Biology* 2004; 267:230-241.

Conner S and Wessel GM. Rab3 mediates cortical granule exocytosis in the Sea Urching egg. *Dev. Biol.* 1998; 203:334-344.

Colleau M, Herve P, Fellmann P and Devaux PF. Transmembrane diffusion of fluorescent phospholipids in human erythrocytes. *Chem. Phys. Lipids* 1991; 57: 29-37.

Connor J. and Schroit AJ. Determination of lipid asymmetry in human red cells by resonance energy transfer. *Biochem* 1987; 26: 5099-5105.

Connor J and Schroit AJ. Transbilayer movement of phosphatidylserine in nonhuman erythrocytes: evidence that the aminophospholipid transporter is a ubiquitous membrane protein. *Biochem* 1989; 28: 9680-9685.

Connor J and Schroit AJ. Aminophospholipid translocation in erythrocytes: evidence for the involvement of a specific transporter and an endofacial protein. *Biochem* 1990; 29:37-43.

Connor J, Pak CH, Zwaal RF and Schroit AJ. Bidirectional transbilayer movement of phospholipids analogs in human red blood cells. Evidence for an ATP-dependent and protein mediated process. *J. Biol. Biochem* 1992; 267: 19412-19417.

Coronel CE and Lardy HA. Characterization of Ca<sup>2+</sup> uptake by guinea pig epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod* 1987; 37:1097-1104.

Cross NL and Meizel S. Methods of evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biol Reprod* 1989; 41:635-641.

Dachary-Prigent J, Freyssinet JM, Pasquet JC, Carron AT and Nurden L. Annexin V as a probe of aminophospholipid exposure and platelet membrane vesiculation: a flow cytometry study showing a role for free sulfhydryl groups. *American Society of Hematology* 1993; 81:2554-2565.

Daleke DL and Huestis WJ. Incorporation and translocation of aminophospholipids in human erythrocytes. *Biochem* 1985; 24: 5406-5416.

Daleke DL, Lyles JV, Nemergut E and Zimmermann ML. Purification and substrate specificity of the human erythrocyte aminophospholipid transporter NATO ASI ser. H. 1995; 91: 49-59.

Daleke DL. Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipids asymmetry. *J. Lipid Res* 2003; 44: 233-242.

DasGupta S, Mills CL and Fraser LR.  $Ca^{2+}$ -related changes in the capacitation state of human spermatozoa assessed by a chlortetracycline fluorescence assay. *J. Reprod Fertil* 1993; 99:135-143.

Davis BK. Timing of fertilization in mammals. Sperm c/f ratio as a determination of the capacitation interval. *Proc Nat Acad Sci*. 1981; 78: 7560-7564.

Davis BK. Uterine fluid proteins bind cholesterol during capacitation in the rabbit. *Experientia* 1982; 38: 1063-1064.

De Jonge CJ, Barrat CL, Radwanska E and Cooke ID. The acrosome reaction-inducing effect of human follicular and oviductal fluid. *J. Androl* 1993; 14: 359-365.

Dekkers DW, Comfurius P, Bevers EM and Zwaal RF. Comparison between calcium-induced scrambling of various fluorescently labelled lipid analogues in red blood cells. *Biochem. J.* 2002; 362: 741-747

De las Heras MA, Valcarcel A, Pérez LJ and Moses DF. Actin localization in ram spermatozoa: effect of freezing/thawing, capacitation and calcium ionophore-induced acrosomal exocytosis. *Tissue Cell* 1997; 29: 47-53.

Smyth DG. Reactions of N-Ethylmaleimide with peptides and amino acids. *Biochem J.* 1964; 91:589-595.

Devaux PF, Zachowski A, Morrot G, Cribier S, Fellman P, Geldwerth D, Bitbol M and Herve P. Control of the transmembrane phospholipid distribution in eukaryotic cells by aminophospholipid translocase. *Biotechnol. Appl. Biochem* 1990;12: 517-522.

Devaux PF, Fellmann P and Herve P. Investigation on lipid asymmetry using lipid probes. Comparison between spin –labeled lipids and fluorescent lipids. *Chem . Phys. Lipids* 2002; 116: 115-134.

Devaux PF and Morris R. Transmembrane asymmetry and lateral domains in biological membranes. *Traffic* 2004; 5: 241-246.

Ding J, Wu Z, Crider BP, Ma Y, Li X, Slaughter C, Gong L, and Xie XS. Identification and functional expression of four isoformas of ATPase II, the putative aminophospholipid translocase. *J. Biol. Chem* 2000; 275, 30: 23378-23386.

Di Vittorio KM, Lambert TN and Smith BD. Steroid –derived phospholipids scramblases induce exposure of phosphatidylserine on the surface of red blood cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 2005;13: 4485-4490.

Doerrler WT and Raetz CR. ATPase activity of the MsbA lipid flippase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem* 2002; 277: 36697-36705.

Drisdell RC, Mack SP, Anderson RA and Zaneveld LJ. Purification and partial characterization of acrosome reaction inhibiting glycoprotein from human seminal plasma. *Biol. Reprod* 1995; 53:201-208.

Dunina-Barkovskaya A. pH dependence of junctional conductance. *Membr Cell Biol* 1998;11: 793-801.

Egozcue S, Blanco J, Vidal F and Egozcue J. Diploid sperm and the origin of triploidy. *Human Reproduction* 2002;17: 5-7.

Emiliozzi C and Fenichel P. Protein tyrosine phosphorylation is associated with capacitation of human sperm in vitro but is not sufficient for its completion. *Biol. Reprod* 1997; 56: 674-679.

Fabbri R, Porcu E, Lenzi A, Gandini L, Marsella T and Flamigni C. Follicular fluid and human granulosa cell cultures: influence on sperm kinetic parameters, hyperactivation, and acrosome reaction. *Fertil Steril* 1998; 69: 112-117.

Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Brantton DL and Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic cell. *J. Immunol* 1992; 148, 2207-2216.

Fadok VA, de Cathelineau A, Daleke DL, Henson PM and Bratton DL. Loss of phospholipids asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblast. *J. Biol. Chem* 2001;176: 1071-1077.

Farge E and Deveraux PF. Shape changes of giant liposomes induced by an asymmetric transmembrane distribution of phospholipids. *J. Biophys* 1992; 61:347-357.

Fleming AD and Yanagimachi R. Evidence suggesting the importance of fatty acids and the fatty acid moieties of sperm membrane phospholipids in the acrosome reaction of guinea pig spermatozoa. *J. Exp. Zool* 1984; 229:485-489.

Florman HM and First NL. The regulation of acrosomal exocytosis. I. Sperm capacitation is required for the induction of the acrosome reactions by the bovine zona pellucida in vitro. *Dev. Biol* 1988; 128: 453-463.

Foresta C, Rossato M and Di Virgilio F. Ion fluxes through the progesterone activated channel of the sperm plasma membrane. *Biochem J.* 1993; 294:279-283.

Fraser LR. Minimum and maximum extracellular Ca<sup>2+</sup> requirements during mouse sperm capacitation and fertilization in vitro. *J. Reprod Fertil* 1987; 81:77-89.

Fraser LR, Umar G and Sayed S. Na<sup>+</sup>-requiring mechanism modulate capacitation and acrosomal exocytosis in mouse spermatozoa. *J. Reprod Fertil* 1993; 97:539-549.

Fraser LR. Na<sup>+</sup> requirements for capacitation and acrosomal exocytosis in mammalian sperm. *Int. Rev. Cytol* 1994; 149:1-46.

Fraser LR. Sperm capacitation and the acrosome reaction. Review. *Hum Reprod* 13 Suppl 1998; 1:9-19.

Freshman JL. Semen collection and evaluation. *Clinical techniques in small animal practice* 2002; 17: 104-107.

Frits M, Flesch FM and Barend M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta* 2000;1469: 197-235.

Frits M, Flesch FM, Brouwers JF, Nievelstein PFEM, Verkleij AJ, Van Golde LM, Colenbrander B, Barend M and Gadella BM. Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *J. Cell sci* 2001; 114: 43-3555.

Fusi FM, Lorenzetti I, Vignali M and Bronson RA. Sperm surface proteins after capacitation. *J. Androl* 1992; 13: 488-497.

Gadella BM, Nievelstein PFEM, Colenbrander B and Van Kooij R. *Human Reprod* 1996; 11: 43.

Gadella BM. Scrambling of phospholipid asymmetry in the apical plasma membrane of acrosome-intact boar sperm cells during in vitro capacitation. *Biol Reprod* 1999; 60 (Suppl 1), 207.

Gadella BM and Harrison RAP. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development* 2000; 127:2407-2420.

Gadella BM and Harrison RAP. Capacitation induces cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. *Biol Reprod* 2002; 67: 340–350.

Gafo C, Garde JJ. Métodos de valoración de la capacitación y reacción acrosómica en mamíferos. *Med Vet* 1994; 11: 201-210.

García-Macedo R, Rosado A, Hernández-Pérez O, Mercado E, Betancourt JM and Baiza LA. Efecto de los inhibidores de H<sup>+</sup>-ATPases durante la maduración, capacitación y reacción acrosomal del espermatozoide de conejo. Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco. México D.F. 2000.

García-Macedo R, Rosales-Torres AM, Hernández-Pérez O, Chavarría ME, Reyes A and Rosado A. . Effect of bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar (B-Type) proton ATPases, on the capacitation of rabbit spermatozoa. *Andrología* 2001; 33: 113-121.

García-Macedo R, Martínez R, Rábago M, Hernández-Pérez O, Reyes A and Rosado A. Subcellular distribution of phospholipase A2 and ATPases during capacitation and acrosome reaction in guinea pig spermatozoa. *Arch. Androl* 1991; 26:93-105.

Gasgard P, Tran D, Sauvage M, Sulpice JC, Fukami K, Takenawa T, Claret M and Giraud F. Characterization of structural and functional phosphoinositide domains in human erythrocyte. *Bioch. Biophys. Acta* 1991; 1069: 27-36.

Geppert M and Sudhof TC. Rab3 and synaptotagmin: the yin and yang of synaptic membrane fusion. *Annu. Rev. Neurosci.* 1998;21:75-95.

Gillies RJ, Peterson EP and Perona R. The role of intracellular pH in mammalian cell proliferation. *Cell Physiol Biochem* 1992; 2:159-179.

Giojalas LC. Correlation between response to progesterone and other functional parameters in human spermatozoa. *Fertil Steril* 1998; 69:107-111.

Glander HJ and Schaller J. Binding of annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage. *Mol. Hum. Reprod* 1999; 5: 109-115.

Graham TD. Flippases and vesicle-mediated protein transport. *TRENDS in Cell Biol* 2004; 14: 670-677.

Green CM, Cockie SM, Watson PF and Fraser LR. Stimulating effect of pyroglutamylproline amide a prostatic TRH-related tripeptide, on mouse sperm capacitation and fertilizing ability in vitro. *Mol Reprod Dev* 1994; 38: 215-223.

Guerrero A and Darszon A. Evidence for the activation of two different  $Ca^{2+}$  channels during the egg jelly-induced acrosome reaction of sea urchin sperm. *J. Biol. Chem* 1989; 264:19593-19599.

Guzmán GMA, Palomar-Morales M and Hicks GJJ. Sistemas moleculares en las interacciones celulares I: Fecundación en mamíferos. *Ginecología y obstetricia de México* 1992; 60: 299-306.

Hafez ESE and Hafez B. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7ª ed. 2002. Mc Graw-Hill Interamericana México. Pp 108.

Harkeman W, Harrison RAP, Miller NGA, Topper, EK and Woelders H. Enhanced binding of zona pellucida proteins to the acrosomal region of intact

board spermatozoa in response to fertilizing conditions: a flow cytometric study. Biol reprod 1998; 58: 421-430.

Harrison RAP. Capacitation mechanism and role of capacitation as seen in eutherian mammals. Reprod Fertil Dev 1996; 8: 581-594.

Heid H, Figge WU, Winter S, Kuhn R, Zimbelmann R and Franke WW. Novel actin-related proteins Arp-T1 and Arp-T2 as components of the cytoskeletal calyx of the mammalian sperm head. Experimental Cell Research 2002; 279:177-187.

Hicks JJ, Pedrón N, and Rosado A. Modifications of the human spermatozoa glycolysis by cyclic adenosine monophosphate (cAMP), estrogens and follicular fluid. Fertil Steril 1972; 23: 886-893.

Hinkovska V, Dimitrov GP and Koumanov KD. Phospholipid composition and phospholipid asymmetry of ram spermatozoa plasma membranes. Int. J Biochem 1986; 18:1115-1121.

Hoffmann PR, de Cathelineau AM, Ogden CA, Leverrier Y, Bratton DL, Daleke DL, Ridley AJ, Fadok VA and Henson PM. Phosphatidylserine induces PS receptor mediated macropinocytosis and promotes clearance of apoptotic cells. J. Cell Biol 2001; 155: 649-659.

Howes EA, Hurst SM and Jones R. Actin and actin-binding proteins in bovine spermatozoa: potential role in membrane remodelling and intracellular signaling during epididymal maturation and the acrosome reaction. Journal of Andrology 2001; 22: 62-72.

Huacuja L, Delgado NM, Merchant H, Pancardo RM and Rosado A. Cyclic AMP induced incorporation of 33pi into human sperm membrane components. Biol. Reprod 1977; 17:89-96.

Huacuja L, Delgado NM, Wans MA, Pedrón N and Rosado A. Exchange of lipids between spermatozoa and seminal plasma in normal and pathological human semen. *Arch. Androl* 1981; 25: 125-129.

Hyne RV, Higginson RE, Kohlman D and Lopata D. Sodium requirement for capacitation and membrane fusion during the guinea pig sperm acrosome reaction. *J. Reprod. Fertil* 1984; 70: 83-94.

Jackson RC and Modern PA. N-Ethylmaleimide-sensitive proteins in cortical exocytosis in the sea urching egg: localization to both cortical vesicles and plasma membrane. *Journal of Cell Sci.* 1990; 96:313-321.

Jagannathan S, Publicover SJ and Barratt CR. Voltage-operated calcium channels in male germ cells. *Reproduction* 2002; 123: 203-215.

Jones R. Sperm survival versus degradation in the mammalian epididymis: a hypothesis. *Biol. Reprod* 2004; 71: 1405-1411.

Johnson JE, Zimmermann ML, Daleke DL and Newton AC. Lipid structure and not membrane structure is the major determinant in the regulation of protein kinase C by phosphatidylserine. *Biochem* 1998; 37: 12020-12025.

Julien M, Tournier JF and Tocanne JF. Lateral motions of fluorescent analogs of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in the apical plasma membrane of bovine aortic endothelial cells. *Exp. Cell Res* 1993; 208:387-397.

Kagan VE, Fabisiak JP, Shevedoba AA, Tyurina YY, Tyurin VA, Schor NF and Kawai K. Oxidative signaling pathway for externalization of plasma membrane phosphatidylserine during apoptosis. *FEBS Letters* 2000; 477: 1-7.

Kirkman-Brown JC, Punt EL, Barratt CL and Publicover SJ. Zona pellucida and progesterone-induced Ca<sup>2+</sup> signaling and acrosome reaction in human spermatozoa. *J Androl* 2002; 23: 306-315.

Köhn FM, Mack SR, Schill WB and Zaneveld LJD. Detection of human sperm acrosome reaction: comparison between methods using double staining, *Pisum sativum agglutinin*, concanavalin A and transmission electron microscopy. Human Reprod 1997; 12:714-721.

Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, and Van Oers MH. Annexin-V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on  $\beta$  cells undergoing apoptosis. Blood 1994; 84:1415-1420.

Krausz C, Bonaccorsi L, Luconi M, Fuzzi B, Criscuoli L, Pellegrini S, Forti G and Baldi E. Intracellular calcium increase and acrosome reaction in response to progesterone in human spermatozoa are correlated with in vitro fertilization. Human Reprod 1995; 10:120-124.

Kumakiri J, Oda S, Kinoshita K and Miyazaki S. involvement of Rho family G protein in the cell signaling for sperm incorporation during fertilization of mouse eggs: inhibition by *Clostridium difficile* toxin B. Developmental Biology 2003; 260: 522-535.

Kurz A, Viertel D, Herrmann A and Müller K. Localization of phosphatidylserine in boar sperm cell membranes during capacitation and acrosome reaction. Reproduction 2005; 130: 615-626.

Kuypers A, Lewis A and Hua M. Determination of altered membrane phospholipid asymmetry in subpopulations of human red blood cells using fluorescently labeled annexin V. Blood 1996; 87: 1179-1187.

Landin-Alvarenga FC, Gram JK, Alvarenga MA and Squires EL. Calcium influx into equine and bovine spermatozoa during *in vitro* capacitation. Animal Reprod 2004; 1: 96-105.

Langlais J, Zollinger M, Plante L, Chapdelaine A, Bleau G and Roberts KD. Localization of cholesteryl sulfate in human spermatozoa in support of a

hypothesis for the mechanism of capacitation. Proc Natl Acad Sci USA 1981; 72: 66-70.

Langlais J and Roberts KD. A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. Gamete Res 1985; 12: 183-224.

Larson LJ and Miller JD. Simple histochemical stain for acrosomes on sperm from several species. Molecular reproduction and development 1999; 52: 445-449.

Lassalle B, and Testart J. Human Zona Pellucida recognition associated with removal of sialic acid from human sperm surface. J. Reprod Fertil 1994; 101: 703-711.

Lax Y, Rubinstein S and Breitbart H. Epidermal growth factor induces acrosomal exocytosis in bovine sperm. Febs letters 1994; 339: 234-238.

Lefievre L, Jha K N, de Lamirande E, Visconti PE and Gagnon C. Activation of protein kinase A during human sperm capacitation and acrosome reaction. Journal of Andrology 2002; 23: 709-716.

Lentz BR. Exposure of platelet membrane phosphatidylserine regulates blood coagulation. Prog. Lipid Res 2003; 4: 423-438.

Liévano A, Vega Saenz de Miera EC and Darszón A. Channels from the sea urchin sperm plasma membrane. J. Gen. Physiol 1990; 95: 273-296.

Lin Y, Kan FW. regionalization and redistribution of membrane phospholipids and cholesterol in mouse spermatozoa during in vitro capacitation. Biol. Reprod 1996; 55: 1133-1146.

Lin M, Hess R and Aitken JR. Induction of sperm maturation in vitro in epididymal cellcultures of the tammar wallaby (*Macropus eugenii*): disruption of

motility initiation and sperm morphogenesis by inhibition of actin polymerization. *Reproduction* 2002; 124:107-117.

Llanos MN, Morales P And Riffo MS. Studies of lysophospholipids related in the hamster sperm acrosome reaction in vitro. *J Exp. Zool* 1993; 267: 209-216.

Llanos MN. Evidence in support of a role for Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in the hamster sperm acrosome reaction. *J. Exp. Zool* 1994; 269: 484-488.

Maier O, Oberle V and Hoekstra D. Fluorescent lipid probes: some properties and applications (a review). *Chem. Phys. Lipids* 2002; 116: 3-18.

Mann T and Lutwaak-Mann C. Male reproductive function and semen, Springer, Berlin 1981.

Manodori AB and Kuypers FA. Altered red cell turn over in diabetic mice. *J. Lab Clin. Med.* 2002; 140: 161-165.

Marina RF. Técnicas de reproducción asistida en hombres seropositivos al virus de la inmunodeficiencia humana Tipo-1 (VIH-1). Tesis de doctorado. 2001; 1-87.

Marti E, Perez-Pe R, Muino-Blanco T, Cebrian-Perez JA. Comparative study of four different sperm washing methods using apoptotic markers in ram spermatozoa. *J Androl.* 2006; 6: 746-53.

Meers P and Mealy T. Phospholipid determinants for annexin-V binding sites and the role of tryptophan 187. *Biochemistry* 1994; 19: 5829-37.

Meizel S and Dreamer DW. The pH of the hamster sperm acrosome. *J Histochem Cytochem* 1978; 26: 98-105.

Meizel S. Molecules that initiate or help stimulate the acrosome reaction by their interaction with the mammalian sperm surface. *Am. J. Anat* 1985; 174: 285-302.

Meizel S and Turner KO. Initiation of the human sperm acrosome reaction by thapsigargin. *J. Exp. Zool* 1993; 267: 350-355.

Michel BJ, Theau CM and Bolet G. The relationship between rabbit semen characteristics and reproductive performance after artificial insemination. *Animal Reprod. Sci* 2002; 70: 139-149.

Miller DJ, Gong X and Shur BD. Sperm require  $\beta$ -N-acetyl-glucosaminidase to penetrate through the egg zona pellucida. *Development* 1993; 118: 1279-1289.

Moolenaar WH. Effects of growth factors on intracellular pH regulation. *Annu Rev Physiol* 1986; 48: 363-376.

Moreno-Fierros L, Hernández EO, Salgado ZO and Mujica A. F-actin in guinea pig spermatozoa: its role in calmodulin translocation during acrosome reaction. *Molecular Reproduction and Development* 1992; 33: 172-181.

Mouro I, Halleck MS, Shlegel RA, Mattei MG Williamson, P, Zachowski A, Devaux PF, Cartron JP and Colin Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1999; 257: 333-339.

Müller K, Pomorski T, Müller P, Zachowski A and Herrmann A. Protein-dependent translocation of aminophospholipids and asymmetric transbilayer distribution of phospholipids in the plasma membrane of ram sperm cells. *Biochem* 1994; 33: 9968-9974.

Müller P, Pomorski T, Porwoli S, Tauber R and Herrmann A. Transverse movement of spin-labeled phospholipids in the plasma membrane of a hepatocytic cell line (HepG2): implications for biliary secretion. *Hepatology* 1996; 24: 1497-1503.

Myles DG and Primakoff P. Localized surface antigens of guinea pig sperm migrate to new regions prior to fertilization. *J. Cell Biol* 1984; 99: 1634-1641.

Nelson N. Structure and pharmacology of the proton-ATPases. *Trends Pharmacology Sci* 1991; 12: 71-75.

Nolan JP, Magargee SF, Posner RG and Hammerstedt R. Flow cytometric analysis of transmembrane phospholipid movement in bull sperm. *Biochemistry* 1995; 33: 9968-9974.

Okabe M, Adachi T, Takada K, Oda H, Yagasaki M, Kobama Y and Mimura T. Capacitation related changes in antigen distribution in mouse sperm heads and its relation to fertilization rate in vitro. *J. Reprod. Immunol* 1987; 11: 91-100.

Oliphant G, Reynolds AB and Thomas TS. Sperm surface components involved in the control of the acrosome reaction. *Am. J. Anat* 1985; 174: 269-283.

Onishi H, Samuelson LC, Yule DL, Ernst SA and Williams JA. Overexpression of Rab3D enhances regulated amylase secretion from pancreatic acini of transgenic mice. *J. Clin. Invest.* 1997; 100:3044-3052.

Osheroff JE, Visconti PE, Valenzuela JP, Travis JA, Álvarez J and Kopf SG. Regulation of human sperm capacitation by a cholesterol efflux-stimulated signal transduction pathway leading to protein kinase A mediated up-regulation of protein tyrosine phosphorylation. *Mol. Hum. Reprod* 1999; 11: 1017-26.

Patrat C, Serres C and Jouannet P. The acrosome reaction in human spermatozoa. *Biol. Of the Cell* 2000; 92: 255-266.

Parent S, Lefievre L, Brindle Y and Sullivan R. Bull subfertility is associated with low levels of a sperm membrane antigen. *Molecular reproduction and development* 1999; 52: 57-65.

Pastore A, Russo AL, Greco M, Rizzoni G and Federicil G. Semiautomated method for determination of cystine concentration in polymorphonuclear leukocytes. Technical Briefs 2000.

Patrat C, Serres C and Jouannet P. The acrosome reaction in human spermatozoa. *Biol. of the Cell* 2000; 92:255-266.

Pelletier R, Trifaro JM, Carvajal ME, Okawara Y and Vitale ML. Calcium – dependent actin filament-severin protein scinderin levels and localization in bovine testis, epididymis and spermatozoa. *Biology of Reproduction* 1999; 60: 1128-1136.

Pigault C, Follenius-Wund A, Schmutz M, Freyssinet JM, and Brisson A. Formation of two dimensional arrays of annexin-V on phosphatidylserine-containing liposomes. *J. Mol. Biol* 1994; 336:199-208.

Pomorski T, Müller P, Zimmermann B, Burguer K, Devaux PF and Herrmann A. Transbilayer movement of fluorescent and spin-labeled phospholipids in the plasma membrane of human fibroblast: a quantitative approach. *J. Cell Sci* 1996; 109: 687-698.

Pomorski T, Herrmann A, Müller P, Van Meer G and Burguer K. Protein mediated inward translocation of phospholipids occurs in both the apical and basolateral plasma membrane domains of epithelial cells. *Biochem* 1999; 38: 142-150.

Primakoff P and Myles DG. A map of the guinea pig sperm surface constructed with monoclonal antibodies. *Dev. Biol* 1983; 98: 417-428.

Quill AT, Sugden AS, Rossi LK, Doolittle KL, Hammer ER and Garbers LD. Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization. *PNAS* 2003; 25: 14869-14874.

Rana ABS, Misra S, Majumder GC and Ghosh A. Phospholipid asymmetry of goat sperm plasma membrane during epididymal maturation. *Biochem Biophys Acta* 1993; 1210: 1-7.

Ren D, Navarro B, Perez G, Jackson AC, Hsu S, Shi Q, Tilly JL and Clapham D. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature* 2001; 413: 603-609.

Revah I, Gadella BM, Flesh FM, Colembrander B and Suárez SS. *Biol. Reprod* 2000; 62: 1010-1015.

Reyes A, Mercado E and Rosado A. Inhibition of capacitation and of the fertilizing capacity of rabbit spermatozoa by blocking membrana sulhydryl groups. En: *Recent advances in human reproduction. Excerpta medical international Congress Series Amsterdam 1976 Pp. 322-324.*

Reyes A, Goicoechea B and Rosado A. Calcium requirement for rabbit spermatozoal capacitation and enhancement of fertilizing ability by ionophore a23187 and cyclic adenosine 3':5'-monophosphate. *Fertility and Sterility* 1978; 29: 451-455.

Reyes A y Chavarría ME. Regulación bioquímica de la reacción acrosomal en el espermatozoide de mamífero. *Gac. Med. México* 1987; 123: 261-267.

Reyes A, Delgado NM, Chavarría ME y Rosado A. Algunos conceptos nuevos sobre el mecanismo terminal de la fertilización en los mamíferos. *Ginec. Obstet. México* 1990; 58: 292-299.

Richardson RT, Nikolajczyk BS, Abdllah LH, Beavers JC and O'Rand MG. Localization of rabbit sperm acrosin during the acrosome reaction induced by immunobilized zona matrix. *Biol Reprod* 1991; 45: 20-26.

Rivlin J, Mendel J, Rubinstein S, Etkovitz N and Breitbart H. Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. *Biology of Reproduction* 2004; 70: 518-522.

Robitaille G, Sullivan R and Bleau G. Identification of epididymal proteins associated with hamster sperm. *J Exp Zool* 1991; 258: 69-74.

Rodríguez L, Stirling CJ and Woodman PG. Multiple N-Ethylmaleimide-sensitive components are required for endosomal vesicle fusion. *Mol. Biol. of the Cell* 1994; 5:773-783.

Rogers BJ, Ueno M and Yanagimachi R. Fertilization by guinea pig spermatozoa requires potassium ions. *Biol. Reprod* 1981; 25: 639-648.

Rogers BJ and Perreault SD. Importance of glycolysable substrates for in vitro capacitation of human spermatozoa. *Biol. Reprod* 1990; 43: 1064-1069.

Rosado A, Velásquez A and Lara-Ricalde R. Cell Polarography. II. Effect of neuraminidase and follicular fluid upon the surface characteristics of human spermatozoa. *Fertil Steril* 1973; 24: 349-354.

Rosado A. Aspectos nuevos de viejas ideas sobre la capacitación y la reacción acrosomal. *Arch. Invest. Med. México* 1988; 19: 253-260.

Rosales-Torres AM, Ávalos-Rodríguez A, Vergara-Onofre M Hernández-Pérez O, Ballesteros LM, García-Macedo R, Ortiz-Navarrete V and Rosado A. Multiparametric study of atresia in ewe antral follicles: Histology, flow cytometry, internucleosomal DNA fragmentation, and lysosomal enzyme activities in granulosa cells and follicular fluid. *Mol Reprod and Develop* 2000; 55: 270

Sabeur K, Edwards DP and Meizel S. Human sperm plasma membrane progesterone receptor(s) and the acrosome reaction. *Biol Reprod* 1996; 54: 993–1001.

Saling PM and Storey BT. Mouse Gamete interactions during fertilization in vitro: cholortetracycline as a fluorescent probe for the mouse sperm acrosome reaction. *J. Cell Biol* 1979; 83: 544-555.

Sanchez-Gutiérrez M, Contreras RG and Mujica A. Cytochalasin-D retards sperm incorporation deep into the egg cytoplasm but not membrane fusion with the egg plasma membrane. *Molecular Reproduction and Development* 2002; 63: 518-528.

Schneider E, Haest CWM, Plasa G and Deuticke B. Bacterial cytotoxins, amphotericin B and local anesthetics enhance transbilayer mobility of phospholipids in erythrocyte membranes. Consequences for phospholipid asymmetry. *Biochim. Biophys. Acta* 1986; 855: 325-336.

Schroit AJ and Zwaal RFA. Transbilayer movement of phospholipids in red cell and platelet membranes. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1071: 313.

Seigneuret M and Devaux PF. ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1984; 81: 3751-3755.

Sleight RG and Pagano RE. Transbilayer movement of a fluorescent phosphatidylethanolamine analogue across the plasma membranes of cultured mammalian cells. *J. Biol. Chem* 1985; 260: 1146-1154.

Spungin B, Margalit I and Breitbart H. Sperm exocytosis reconstructed in a cell-free system. Evidence for the involvement of phospholipase C and actin filaments in membrane fusion. *Journal of Cell Science* 1995; 108: 2525-2535.

Spungin B and Breitbart H. Calcium mobilization and influx during sperm exocytosis. *Journal of Cell Science* 1996; 109: 1974-1955.

Suarez SS and Dai XB. Intercellular calcium increases with hyperactivation in intact moving hamster sperm and oscillates with the flagellar beat cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 4660-4664.

Sulpice JC, Alain Z, Philippe FD and Françoise G. Requirement for phosphatidylinositol 4,5-Biphosphate in the Ca<sup>2+</sup> induced phospholipid redistribution in human erythrocyte membrane. *The journal of Biochemistry and Molecular Biology* 1994; 269: 6347-6354.

Swanson EW and Berden HJ. An eosin nigrosin stain for differentiating live and dead bovine spermatozoa. *J. Animal Sci* 1951; 10: 981-87.

Takkar JK, East J and Franson RC. Modulation of phospholipase A2 activity associated with human sperm membranes by divalent cations and calcium antagonist. *Biol. Reprod* 1984; 30: 679-686.

Tanaka H, Yoshimura Y, Nishina Y, Nozaki M, Nojima H and Nishimune Y. Isolation and characterization of cDNA clones specifically expressed in testicular germ cells. *FEBS Letters* 1994; 355: 4-10.

Tang X, Halleck MS, Schlegel RA and Williamson P. A subfamily of P-type ATPases with aminophospholipid transporting activity. *Sci.* 1996; 272: 1495-1497.

Thérien I and Manjunath P. Effect of progesterone on bovine sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol. Reprod* 2003; 69: 1408-1415.

Tilley L, Cribier S, Roelofsen B, Op den Kamp JAF, Van Deenen LLM. ATP-dependent translocation of aminophospholipids across the human erythrocyte membrane. *FEBS Lett* 1986; 194: 21-27.

Thomas P and Meizel S. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphato hydrolysis in human sperm stimulated with follicular fluid or progesterone is dependent upon Ca<sup>2+</sup> influx. *Biochem J.* 1989; 264: 539-546.

Travis AJ and Kopf GS. The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. *J. Clin. Invest* 2002; 110: 731-736.

Uguz C, Vredenburg WL, Parrish JJ. Heparin induced capacitation but not intracellular alkalinization of bovine sperm is inhibited by Rp-adenosine-3' 5'-cyclic monophosphorothioate. *Biol Reprod* 1994; 51: 1031-1039.

Tyurina YY, Shvedoba AA, Kawai K and Tyurin VA. Phospholipid signaling in apoptosis: peroxidation and externalization of phosphatidylserine. *Toxicology* 2001; 48: 93-101.

Vance JE and Steembergen R. Metabolism and functions of phosphatidylserine. *Prog. Lipid Res* 2005; 44: 207-234.

Vendrel JM. Patrones espermatogénicos basales y desarrollo embrionario temprano tras ICSI en oligoastenozoospermia secretora severa. 2003. Pp. 10. Barcelona España.

Vermes I, Clemens H, Helga S and Chris R. A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of immunological Methods* 1995; 184: 39-51.

Virtanen I, Badley RA, Paasivuo R and Lehto VP. Distinct cytoskeletal domains revealed in sperm cells. *Journal of Cell Biology* 1984; 99: 1083-1091.

Visconti PE, Moore GD, Bailey JL, Leclerc P, Connors SA, Pan D, Olds-Clarke P and Kopf GS. Capacitation in mouse spermatozoa II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP- dependent pathway. *Development* 1995; 121: 1139-1150.

Vogl AW. Distribution and function of organized concentrations of actin filaments in mammalian spermatogenic cells and Sertoly cells. *Int Rev Cytol* 1989; 119: 1-56.

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

Von Bulow M, Rackwitz HR, Zimbelmann R and Franke WW. CP beta 3, a novel isoform of an actin-binding protein, is a component of the cytoskeletal calyx of the mammalian sperm head. *Experimental Cell Research* 1997; 233: 216-224.

Vredenburg-Wilberg WI and Parrish JJ. Intracellular pH of bovine sperm increases during capacitation. *Mol Reprod Dev* 1995; 40: 490-502.

Wassarman PM. Mouse gamete adhesion molecules. *Biol Reprod* 1992; 2: 186-91. Review.

Weng J, Mata L, Azarian SM, Tzekov RT, Birch DG and Travis GH. Insights into the function of Rim protein in photoreceptors and etiology of Stargardt's disease from the phenotype in *abcr* knockout mice. *Cell* 1999; 98: 13-23.

Williamson P, Algarin L, Bateman J, Choe HR and Schlegel RA. Phospholipid asymmetry in human erythrocyte ghosts. *J. Cell Physiol* 1985; 123: 209-214.

Williamson P, Kulick A, Zachowski A, Schlegel RA and Devaux PF.  $Ca^{++}$  induces transbilayer distribution of all major phospholipids in human erythrocytes. *Biochemistry* 1992; 31: 6355-6360.

Working PK and Meizel S. Correlation of increased intraacrosomal pH with the hamster sperm acrosome reaction. *J Exp Zool* 1983; 227: 97-107.

Xu X, Star RA, Tortorici G and Muallem S. Depletion of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores activates nitric-oxide synthase to generate cGMP and regulate  $\text{Ca}^{2+}$  influx. *J. Biol. Chem* 1994; 269: 12645-12653.

Yagi A and Paranko J. Actin, alpha-actinin, and spectrin with specific associations with the postacrosomal and acrosomal domains of bovine spermatozoa. *Anatomical Record* 1995; 241: 77-87.

Yanagimachi R, Noda YD, Fujimoto M and Nicolson G. The distribution of negative surface charges on mammalian spermatozoa. *Am J. Anat* 1972; 135: 497-520.

Yanagimachi R. Requirement of extracellular calcium ions for various stages of fertilization and fertilization-related phenomena in the hamster. *Gamete Res* 1982; 5: 323-330.

Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In *The Physiology of Reproduction*. Knobil E, Neill JD (Eds). New York: Raven Press. 1994 Pp. 189-315.

Yudin AI, Gottlieb W and Meizel S. Ultrastructural studies of the early events of the human sperm acrosome reaction as initiated by human follicular fluid. *Gamete Res* 1988; 20: 11-24.

Yunes R, Michaut M, Tomes C and Mayorga LS. Rab3A Triggers the acrosome reaction in permeabilized human spermatozoa. *Biol. Of Reprod* 2000; 62: 1084-1089.

Zachowski A, Herrmann A, Paraf A and Devaux PF. Phospholipid outside-inside translocation in lymphocyte plasma membranes is a protein-mediated phenomenon. *Biochem. Biophys. Acta* 1987; 897: 197-200.

Zeng Y, Oberdorf JA and Florman M. pH regulation in mouse sperm: Identificación of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$  dependent and arylaminobenzoate-dependent

regulatory mechanisms and characterization of their roles in sperm capacitation. *Dev Biol* 1996; 173: 510-520.