

2j'155

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



Facultad de Ciencias

MODIFICACIONES EN LA COMPOSICION LIPIDICA  
MEMBRANAL Y DEL METABOLISMO DEL ESPER-  
MATOZOIDE HUMANO EYACULADO INDUCIDAS  
POR GLYCOSAMINOGLYCANOS SULFATADOS

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
B I O L O G A  
P R E S E N T A :  
S A R A R O J A S D O T O R

México, D. F.

1984



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**I N T R O D U C C I O N**

Para lograr un entendimiento de como funcionan las células la composición molecular detallada y la estructura de las membranas deben ser conocidas, ya que son el primer sitio de interacción con su medio (1).

Las membranas celulares sirven no solamente de barreras estructurales separando compartimientos acuosos de composición variable, sino también participan de manera muy activa en el transporte selectivo controlando las sustancias que pasan a través de ellas, mediante la acción de enzimas características (2).

Se han elaborado diferentes modelos de membrana con los cuales se trata de establecer las formas de combinación de proteínas, lípidos y carbohidratos en la membrana intacta, algunos de ellos son sistemas artificiales como por ejemplo: liposomas que son fosfolípidos organizados en estructuras bicapa vesiculares completamente cerradas, de aspecto y tamaño variable según el grado de agitación-mecánica usada en su preparación (3), películas negras de lípido, se forma una bicapa de fosfoglicéridos separando dos compartimientos acuosos (4). Utilizando diferentes métodos químicos y fisicoquímicos como: marcadores de espín del electrón, donde un ácido graso o un lípido portador de un marcador de spín como el grupo nitrosilo se incorpo

ra a la membrana (5), resonancia magnética nuclear, difracción de rayos X, señaldadores fluorescentes que son utilizados para estudiar la fluidez de la membrana (6, 7, 8).- El uso del microscopio electrónico ha revelado que las membranas sintéticas o biológicas poseen una estructura trilaminar con un espesor total de 7 y 9 nm dependiendo del tipo de sistema de membrana en particular. Mediante estos estudios se ha podido establecer que los lípidos son muy importantes en la formación de la matriz central de las membranas biológicas.

La primera hipótesis importantes sobre la estructura de las membranas biológicas fue propuesta por Davson y Danielli en 1935, estos autores proponen que se podría producir una estructura membranal estable mediante el arreglo simétrico de una bicapa de lípidos cubierta en ambas caras por una capa de proteínas (9).

Posteriormente Robertson propuso un modelo estructural, modificando el de Davson y Danielli, el cual designó como membrana unitaria y que presenta una estructura universal para todas las membranas biológicas. Este modelo considera que la membrana unitaria está constituida por una bicapa de lípidos polares mixtos, con sus cadenas hidrocarbonadas orientadas hacia el interior, formando una fase con

tinua de hidrocarburos y sus cabezas hidrofílicas se encuentran orientadas hacia el exterior y que las proteínas están organizadas en forma extendida más que en la globular (10). Una objeción a este modelo universal proviene de las amplias variaciones que se encuentran en la composición lipídica y proteica y en consecuencia en la actividad de las diferentes membranas.

Actualmente el modelo membranar más aceptado es el del mosaico fluido, postulado por S.J Singer y G.L Nicolson en 1972 (1). Afirma que los fosfolípidos se encuentran organizados en bicapas formando una matriz fluida de cristales líquidos, en esta bicapa, las moléculas lipídicas individuales pueden moverse lateralmente dotando a la bicapa de fluidez, flexibilidad y además de una resistencia eléctrica elevada de relativa impermeabilidad respecto a las moléculas muy polares. Algunas de las proteínas se encuentran parcialmente empotradas en la membrana mientras que otras penetran totalmente en ella, los lípidos están en un estado fluido intermediario debido a la presencia de colesterol y las proteínas externas e internas muestran una asociación con la fase lipídica (figura No. 1).

En base a la proporción química en peso seco de proteínas

o lípidos, tabla No. 1, las membranas pueden ser agrupadas en tres clases: 1) las membranas representadas por la vaina de mielina de los axones nerviosos, la cual tiene muy baja proporción de proteínas con respecto a lípidos y que funcionan fundamentalmente como aislantes, con poca actividad bioquímica, 2) membranas compuestas de aproximadamente del 50% de proteínas representadas por las membranas plasmáticas animales, que comparadas con la vaina de mielina han incrementado su actividad enzimática y de transporte y 3) las membranas cuyos componentes más importantes son las proteínas, como son por ejemplo, las membranas celulares bacterianas y la membrana interna de las mitocondrias, que contiene sistemas enzimáticos complejos y están involucrados en los procesos de transporte, en la forforilación oxidativa y en la síntesis de los ácidos nucleicos (11, 12).

La composición y estructura de las membranas biológicas varían ampliamente según la proporción relativa y categoría de sus lípidos, proteínas y carbohidratos, lo cual es determinante para las características de funcionalidad específicas como antigenicidad, actividad enzimática, transporte, reacciones receptoras y funciones metabólicas tabla No. 2.

La composición de la membrana de los espermatozoides de -

los diferentes mamíferos se caracteriza por su alto contenido en lípidos, de los cuales, en la especie humana; los fosfolípidos representan el 66% tabla No. 3 y las cantidades de colesterol varían dependiendo de la especie, por ejemplo; espermatozoides de carnero y toro que contienen menor cantidad de colesterol que la cantidad presente en espermatozoides de conejo y humano. Diversos trabajos han establecido valores diferentes en las relaciones colesterol/fosfolípidos y ácidos grasos saturados/ácidos grasos-insaturados (13, 14).

Las membranas de los gametos masculino y femenino son de fundamental importancia en los diferentes eventos relacionados con el proceso de reproducción animal (15). Estudiar los cambios de estructura y funcionalidad de las membranas del espermatozoide humano durante estos eventos, es por tanto de gran trascendencia.

Está bien demostrado que durante el proceso de la maduración epididimaria suceden cambios muy importantes en la composición, estructura y funcionalidad membranal de los espermatozoides, entre otros: disminución en la cantidad de grupos SH y de lípidos, cambios en la permeabilidad membranal y aumento del número de sitios de fijación al AMP cíclico (16, 17). Es posible que estos cambios estén



asociados con el desarrollo de la movilidad progresiva y consecuentemente con la fertilidad del espermatozoide.

Otra serie de cambios necesariamente deberán suceder en las membranas de los espermatozoides durante etapas previas al proceso de la fertilización que permitan la adquisición de la habilidad fertilizante del espermatozoide. Una de estas etapas conocida como capacitación la cual implica cambios en la composición, estructura y funcionalidad de la membrana, fue descrita por primera vez por Austin y Chang en el conejo y en la rata (18, 19); quienes demostraron que es necesaria la estancia de los espermatozoides de ambos mamíferos en el tracto genital femenino correspondiente; para que puedan adquirir la capacidad fertilizante.

Desde entonces numerosos estudios han sido realizados por diferentes investigadores y a la fecha se ha establecido que este proceso es necesario en espermatozoides de otras especies incluyendo al humano (20, 21, 22, 23, 24).

Los cambios relacionados con la capacitación pueden ser inducidos in vitro bajo diferentes condiciones experimentales. Se ha demostrado que espermatozoides eyaculados de humano, lavados e incubados en presencia de diferentes

7

agentes quelantes como EDTA, histidina y cisteína inducen una pérdida del 75% del zinc total presente en la célula-espermática, ésta disminución indujo importantes cambios, principalmente relacionados con el aumento en el consumo de oxígeno y en la movilidad progresiva (25). Efectos similares pueden ser inducidos al incubar los espermatozoides en presencia de AMP cíclico, ATP y líquido folicular humano. La interacción de AMP cíclico y/o líquido folicular con la membrana del espermatozoide, indujo cambios -- conformacionales en las proteínas de estas estructuras -- (26).

Rosado y col. lograron inducir de manera más eficiente estos cambios in vitro adicionando secuencialmente al medio de incubación líquido folicular humano y AMP cíclico, de manera que puedan semejararse las dos fases de capacitación propuestas por Ericsson y Brackett (27, 28), la fase inicial se lleva a cabo en el útero donde actúa el AMP cíclico y la fase final sucede en la trompa de Falopio en donde actúa el líquido folicular humano; los autores proponen que estas dos fases son necesarias para producir capacitación in vivo (29).

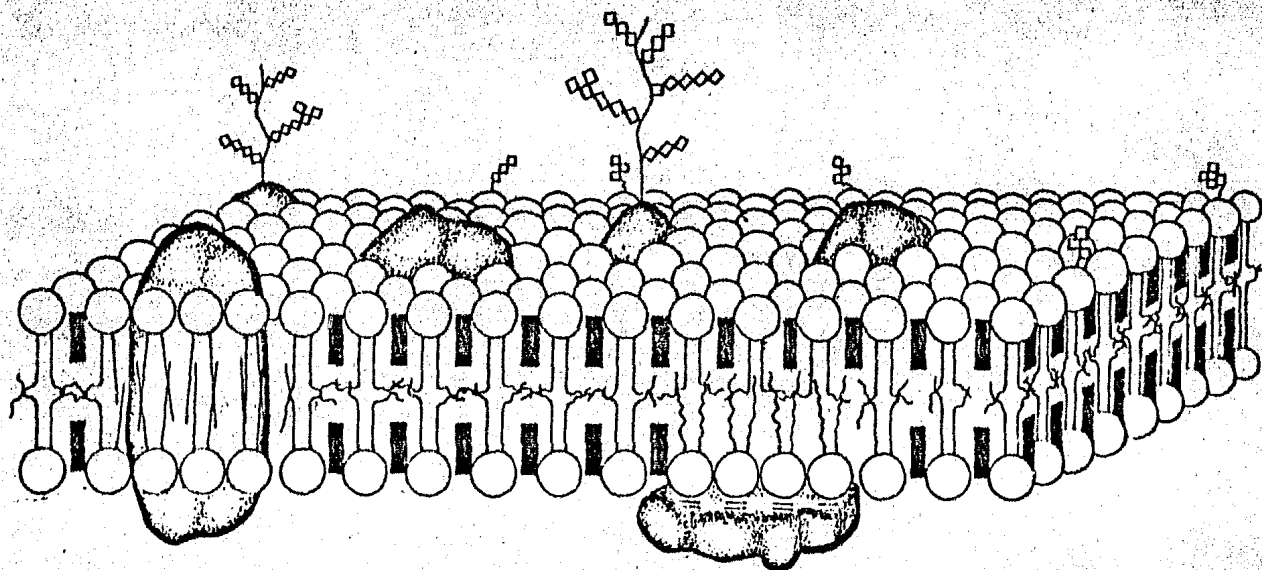
Actualmente una nueva categoría de compuestos (glucosaminoglucanos sulfatados (GAGS) ha sido involucrada en dife--

rentes procesos relacionados en la reproducción de diferentes mamíferos (30, 31). Existen evidencias que estos compuestos son sintetizados en las células foliculares y vertidos al antro folicular, formando parte de la secreción-tubaria cuando sucede la roptura del folículo (32, 33).

Ha sido reportado que la incubación de espermatozoides de humano en presencia de heparina induce la descondensación nuclear (34) y más recientemente se publicó la presencia de sitios de fijación en la membrana del espermatozoide humano, específicos para la heparina (35) así como la mayor eficiencia en la fecundación cruzada de los óvulos de hámster con espermatozoides de humano reincubados con la heparina (36). En relación a estos hallazgos, Lenz y col., indujeron la reacción acrosomal en espermatozoides de conejo, cuando incubaron las células en presencia de heparina y condroitines sulfato A, B y C (37).

Considerando la presencia natural de algunos glucosaminoglucanos sulfatados en el tracto genital femenino de mamíferos, es posible suponer que estas estructuras deben interaccionar de alguna manera con el espermatozoide para que adquiera la capacidad fertilizante; es por ello que se decidió estudiar algunos cambios fisiológicos, bioquímicos y metabólicos relacionados con la capacitación de -

espermatozoides obtenidos de sujetos normospérmicos e incubados en ausencia y en presencia de heparina 20 y 40  $\mu\text{M}$ , cambios que necesariamente deben acontecer antes que se realice la fertilización.



■ Colesterol

⌘ Carbohidratos

○ Lípido anfipático

○ Lípido terminal

FIGURA No. 1

TABLA No. 1 COMPOSICION QUIMICA DE ALGUNAS MEMBRANAS CELULARES

MEMBRANA	PROTEINAS %	LIPIDOS %	CARBOHIDRATOS %	RELACION PROTEINA/ LIPIDO
MIELINA	18	79	3	0.23
MEMBRANAS PLASMATICAS DE PLAQUETAS SANGUINEAS	37.5	54.5	7.5	0.7
CELULAS DE HIGADO DE RATON	46	54	2-4	0.85
ERITROCITOS HUMANOS	49	43	8	1.1
AMOEBAS	54	42	4	1.3
MEMBRANAS NUCLEARES DE CELULAS DE HIGADO DE RATA	59	42	4	1.6
MEMBRANA MITOCONDRIAL				
EXTERNA	52	48	trazas	1.1
INTERNA	76	24	trazas	3.0
RETICULO SARCOPLASMICO	67	33	trazas	2.0
LAMINAS DE CLOROPLASTOS DE ESPINACA	70	30	trazas	2.3
BACTERIAS GRAM-POSITIVAS	75	25	10	3.0
CELULAS HeLa	60	40	2.4	1.5

TABLA No. 2 CARACTERISTICAS DE MEMBRANAS Y COMPONENTES QUIMICOS  
RELACIONADOS.

CARACTERISTICA DE LA MEMBRANA	SISTEMA DE MEMBRANA	COMPONENTES QUIMICOS
BARRERA EN LA PERMEABILIDAD	TODAS LAS MEMBRANAS	LIPIDOS
MATRIZ PARA OTRAS ACTIVIDADES	TODAS LAS MEMBRANAS	LIPIDOS
FLEXIBILIDAD Y DEFORMABILIDAD	TODAS LAS MEMBRANAS	LIPIDOS
PROCESOS DE TRANSPORTE ACTIVO Y PASIVO	LA MAYORIA DE LAS MEMBRANAS	PROTEINAS Y GLUCOPROTEINAS
ACTIVIDAD ENZIMATICA	LA MAYORIA DE LAS MEMBRANAS	GLUCOPROTEINAS Y GLUCOESFINGOLIPIDOS
ADHESION CELULAR	SUPERFICIE DE LAS MEMBRANAS	GLUCOPROTEINAS Y GLUCOESFINGOLIPIDOS
SITIOS RECEPTORES	SUPERFICIE DE LAS MEMBRANAS	PROTEINAS Y GLUCO- PROTEINAS
AISLAMIENTO ELECTRICO	VAINA DE MIELINA	LIPIDOS

TABLA No. 3 COMPOSICION DE FOSFOLIPIDOS DEL SEMEN HUMANO.  
VALORES EXPRESADOS EN PORCIENTO.

FOSFOLIPIDO	ESPERMATOZOIDES	PLASMA SEMINAL
ESFINGOMIELINA	21.4	44.0
FOSFATIDIL SERINA	4.7	11.2
PLASMALOGENO COLINA	2.7	0.8
FOSFATIDIL COLINA	28.8	7.8
ETANOLAMINA PLASMALOGENO	9.4	12.3
FOSFATIDIL ETANOLAMINA	21.6	8.5
FOSFATIDIL INOSITOL	1.9	1.7
CARDIOLIPINA	1.6	0.7
MISCELANEA	7.9	39.0



M A T E R I A L

Y

M E T O D O S

## Muestras Biológicas.

Para la realización del presente estudio, se utilizaron muestras de semen recién eyaculado, obtenidas por masturbación de sujetos normales y fértiles, cuya edad fluctuó entre los 20 y 30 años con abstinencia sexual de por lo menos tres días previos a la recolección de la muestra.

### 1.- Cualificación del semen.

La calidad de las muestras de semen fue evaluada por espermato-bioscopía (38). Las muestras se recibieron en vasos de precipitados limpios y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 30 minutos para permitir la licuefacción; las muestras que durante ese tiempo no licuaron perfectamente no fueron consideradas para el estudio. Una vez pasado el tiempo de licuefacción, el volumen de la muestra fue medido, descartando aquella cuyo volumen fue menor de 2 ml.

La movilidad progresiva del espermatozoide fue valorada por simple apreciación personal por medio del microscopio óptico en contraste de fases a 500 aumentos, en tres campos diferentes tomados al azar, aceptándose como muestras normales aquellas que presentaron movilidad progresiva mayor al 50%.

Los principales contaminantes de una muestra de semen lo constituyen los leucocitos, células de descamación epitelial y cuerpos diversos diferentes a los espermatozoides. Las muestras fueron valoradas en tres campos de observación del microscopio óptico Zeiss en contraste de fases, aquellas que presentaron más de 7 células contaminantes en un campo de observación fueron eliminadas. El número de espermatozoides de cada muestra seleccionada como buena, fue mayor o igual a 50 millones por mililitro del eyaculado.

## 2. Manipulación de las muestras para obtener la suspensión de espermatozoides lavados.

Los espermatozoides fueron separados del plasma seminal por centrifugación durante 20 minutos a 2,800 rpm. en tubos cónicos de plástico, graduados a 15 ml. en una centrifuga clínica Sorvall GLC-1. Los espermatozoides separados del plasma seminal fueron resuspendidos en solución amortiguadora Ringer Krebs, libre de calcio pH 7.4 en proporción de 2 veces el volumen de la muestra, centrifugándose a 2 800 rpm. durante 15 min.

El sobrenadante fue descartado y al precipitado, sin resuspender las células, se adicionó amortiguador Ringer Krebs y se retiró con pipeta Pasteur. Este lavado se re-

pitió dos veces más con el objeto de eliminar el plasma seminal que pudiera quedar adherido en las paredes del tubo; en seguida el precipitado se resuspendió en el amortiguador Ringer Krebs utilizando un volumen igual al de la muestra original.

El número de espermatozoides se determinó por el método del hematocitómetro (39). Este método consiste en el uso de la cámara Neubauer y la micropipeta para glóbulos blancos; con la que se aspiró la suspensión celular hasta la marca 0.5 y después se llenó la micropipeta hasta el aforo, marca 1.1 con la solución fijadora que contiene formal al 1% y citrato de sodio al 2.9%, la pipeta se agitó para homogenizar la suspensión celular desechando las tres primeras gotas antes de llenar la cámara Neubauer, inmediatamente después se aplicó la muestra en la cámara y se dejó reposar 5 minutos para permitir la sedimentación celular; posteriormente se colocó la cámara en la platina del microscopio óptico en contraste de fases y se localizó la cuadrícula para glóbulos blancos procediendo a contar los espermatozoides que se encuentran en los cuatro extremos y el central de la cuadrícula. El número de células de cada cuadro se suma, el resultado se multiplica por 20, factor de la dilución empleada, por 5 que es la quinta parte de la cuadrícula total para glóbulos blan

cos y finalmente por 10,000 para obtener el volumen final de 1 ml. de la suspensión celular. De esta manera se obtiene el número de espermatozoides en millones/ml. de la suspensión celular.

### 3. Cambios en la composición lipídica del espermatozoide.

#### Sistema de incubación.

De la suspensión de espermatozoides lavados como ya se indicó se tomaron alícuotas equivalentes a  $300 \times 10^6$  células, se centrifugaron a 2 800 rpm. durante 15 min. los paquetes celulares se resuspendieron en 3 ml. de solución Ringer Krebs incubándose durante 120 min. a 37°C en ausencia y/o en presencia de heparina 20 y 40 uM. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, los tubos se recibieron en hielo e inmediatamente fueron centrifugados a 2,800 rpm. durante 15 min. en una centrífuga clínica Sorvall GLC-1, a los precipitados se les extrajeron los lípidos de acuerdo al método de Folch (40) y en los sobrenadantes se estudió la presencia de proteínas por electroforesis en geles discontinuos de poliacrilamida.

### 4. Extracción de lípidos totales.

Material y reactivos. Todos los reactivos utilizados fue

ron de grado analítico.

Cloroformo

Metanol

Cloruro de potasio

Columna empacada con fibra de vidrio.

#### Método:

Los precipitados que son el equivalente a  $300 \times 10^6$  espermatozoides se resuspendieron en cloroformo metanol 2:1 v/v, primero 3 ml. de metanol y posteriormente 6 ml. de cloroformo con agitación continua. Los sistemas de extracción se dejaron a temperatura ambiente durante 18 hrs., para permitir la extracción de los lípidos, posteriormente, para eliminar los residuos, los contenidos se filtraron a través de una columna empacada con fibra de vidrio, previamente lavada con cloroformo metanol 2:1 v/v, inmediatamente se adicionaron a los extractos de lípidos KCL-0.05 M en cantidades equivalentes a una quinta parte de los volúmenes de los tubos. Se dejaron a 4°C durante 14-hrs., después se retiraron las fases superiores (acuosa) con el objeto de eliminar el fósforo inorgánico que no corresponde a fosfolípidos.

El extracto de lípidos se ajustó a 10 ml. con cloroformo-metanol 2:1 v/v del cual se tomaron alícuotas de 1 y 3 ml.

para la cuantificación de fósforo inorgánico y colesterol --  
respectivamente.

a) Cuantificación de fósforo de fosfolípidos totales.

Reactivos:

Cloroformo

Metanol

Acido perclórico concentrado

Molibdato de amonio al 5%

Acido sulfúrico 10 N

Reactivo de Fiske.

Equipo:

Espectrofotómetro, modelo Spectronic 21

Aparato termoregulado ajustado a 60° y 180°C.

Método y fundamento:

La cuantificación de fósforo de fosfolípidos totales se efectuó utilizando el método propuesto por Bottoger (41), el cual se basa en la reacción de óxido reducción entre el ácido fosfomolibdico formado y el reactivo de Fiske, formando un cromóforo cuya intensidad de color es directamente proporcional a la cantidad de fosfato inorgánico presente.

Para la cuantificación de fósforo de fosfolípidos totales todo el material de vidrio fue tratado previamente con solución de ácido nítrico 3N durante 24 horas, posteriormente se enjuagaron 5 veces con agua desionizada y se sacaron - en la estufa a 100°C.

En los tubos tratados como ya se mencionó, se evaporó 1 - ml. del extracto cloroformo-metanol en baño maría a 60°C, se adicionaron 100 ul de agua desionizada y 200 ul de ácido perclórico, se sometió a hidrólisis a 180°C durante 45 minutos. El fósforo orgánico se convierte en ortofosfato al calentar el extracto que contienen los lípidos en presencia de una mezcla ácida oxidante. La parte orgánica - se oxida y forma bióxido de carbono que se evapora y el - residuo se analiza como fosfato inorgánico.

Una vez pasado el tiempo de hidrólisis, se enfrió y se rerealizaron las siguientes adiciones:

2.2 ml de agua desionizada

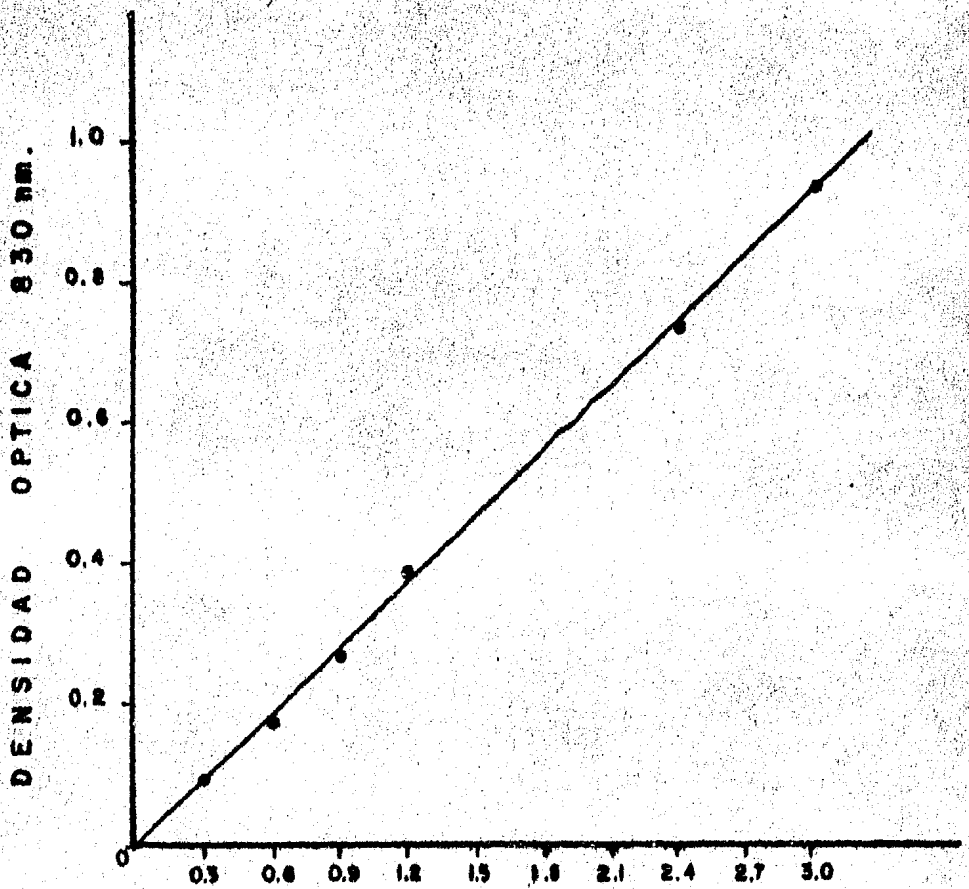
0.15 ml de ácido sulfúrico 10 N.

0.2 ml del reactivo de Fiske.

Inmediatamente después, los tubos se calentaron para desarrollar color a 80°C durante 5 minutos, después se enfriaron en hielo. Simultáneamente se trabajó una curva estan



FIGURA No 2



µg F O S F O R O  
CURVA PATRON DE FOSFORO

dar de fósforo utilizando valores de concentración entre 0.3 y 3.0 ug por sistema. Se realizaron las lecturas a una longitud de onda de 830 nm, usando un espectrofotómetro Bauch & Lomb, modelo Spectronic 21. La figura No. 2 muestra la curva patrón de este método, donde los valores expresan el promedio de 10 determinaciones por duplicado. Las densidades ópticas obtenidas correspondientes a los experimentos, fueron interpoladas en la curva patrón o estandar.

b) Cuantiación de colesterol.

Reactivos:

Cloroformo destilado

Anhídrido acético

Acido sulfúrico.

Equipo:

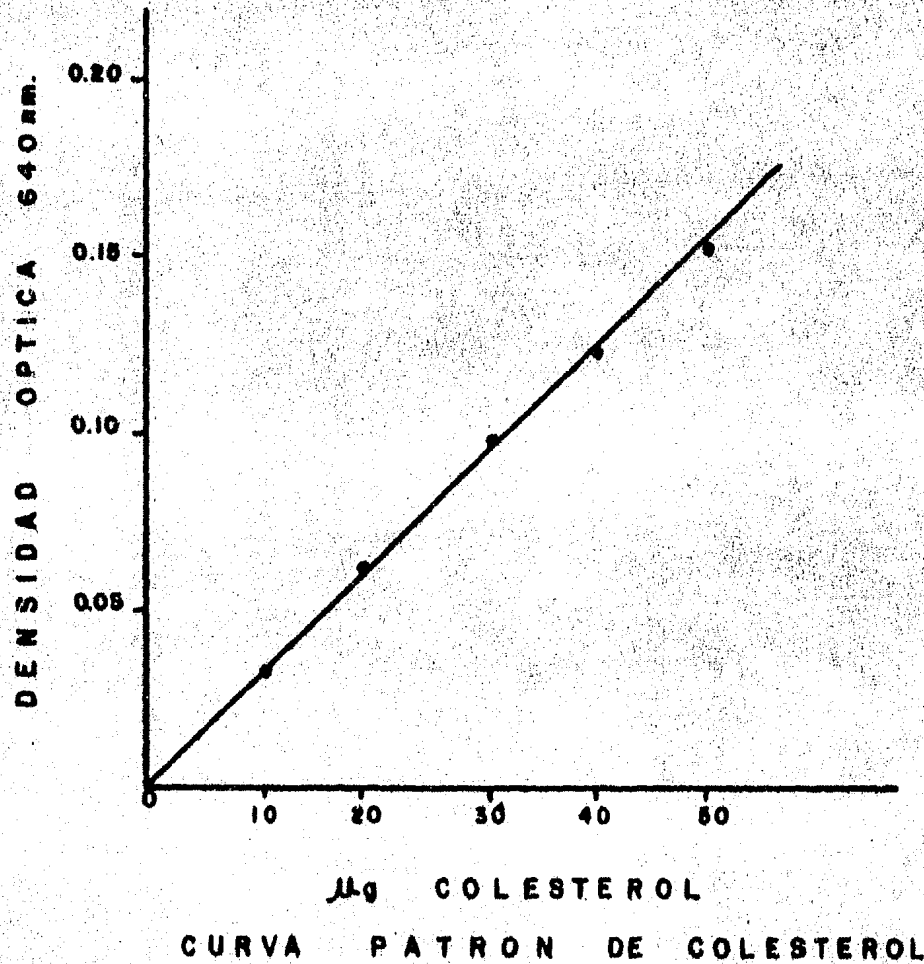
Espectrofotómetro Uvichem 755-C

Baño de agua ajustado a 37°C.

Método y fundamento.

La cuantiación de colesterol se realizó utilizando el método de Ferro (42); el cual elimina pasos adicionales como precipitación y saponificación; cuyo principio se basa en la formación del ácido bis-3-5 colestadieno, el cual -

FIGURA No 3



por medio de la reacción Liebermann-Burchard forma el ácido bis-colestadienil monosulfónico el que en presencia de anhídrido acético y en condiciones fuertemente ácidas, forma un cromóforo de color verde; cuya intensidad de colores es proporcional a la concentración de colesterol presente.

Para la cuantificación de colesterol, se utilizaron 3 ml -- del extracto cloroformo-metanol y se evaporaron en baño -- maría a 60°C, adicionándose secuencialmente los siguientes reactivos:

200 ul de cloroformo

160 ul de anhídrido concentrado

30 ul de ácido sulfurico concentrado

El desarrollo del color se realizó incubando los tubos a 37°C durante 5 minutos.

Simultaneamente se trabajó una curva estandar con valores de concentración entre 10 a 50 ug por sistema, las lecturas se realizaron a una longitud de onda de 640 nm, en un espectrofotómetro Uvichem 755-C, la figura No. 3 muestra la curva patrón de este método, los valores expresan el promedio de 8 determinaciones por duplicado.

##### 5. Electroforesis.

La posible presencia de proteínas en los sobrenadantes --

desprendidos del espermatozoide durante la incubación, -- fue investigada por electroforesis en geles discontinuos de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS) (43). La concentración de acrilamida fue de 3% para el gel espaciador y de 10% para el gel separador con 1 y 9 cm de longitud, respectivamente.

Antes de la electroforesis, todas las muestras (sobrenadantes de incubación en presencia y/o en ausencia de heparina 20 y 40  $\mu$ M), fueron dializadas durante 6 horas a 4°C contra agua bidestilada, después se evaporaron los dializados a sequedad y redisolviéron en 200  $\mu$ l de agua destilada y se calentaron a 100°C durante 3 minutos en presencia de (SDS) 2.5% glicerol, mercaptoetanol, azul de Bromofenol y amortiguador Trisma-base.

Las electroforesis se realizaron con amortiguador Trisma-base 0.025 M, glicina 0.15 M y SDS al 1%, aplicando 2 -- mA/tubo durante 20 minutos; después 6 mA durante 5 horas.

Geles por duplicado fueron trabajados en paralelo con un gel con estandares para pesos moleculares (fosforilasa B, BSA, ovoalbúmina, anhidrasa carbónica inhibidor de soya y lisozima) BIO RAD Low SDS Gels Electrophoresis. Al terminar la electroforesis una serie de geles y el correspon--

diente a los estándares se fijaron y se tiñeron con metanol 50%, ácido acético 10% y azul brillante de Coomassie-0.25%. Otra serie de geles se procesó siguiendo el procedimiento de ácido periódico (44).

#### 6. Determinación de la movilidad, viabilidad y descondensación del núcleo de los espermatozoides.

Para estimar la movilidad, viabilidad y actividad descondensante del núcleo de los espermatozoides, inducidas por la heparina, se utilizaron para cada uno de estos parámetros tres sistemas de incubación con  $50 \times 10^6$  espermatozoides cada uno, en un volumen fijo de 0.5 ml de solución -- Ringer Krebs libre de calcio. El primer sistema de incubación fue el control, sin heparina; al segundo sistema de incubación se le adicionó heparina a una concentración de 20  $\mu\text{M}$  y al tercero heparina 40  $\mu\text{M}$ . Los sistemas de incubación se mantuvieron a  $37^\circ\text{C}$  con agitación continua.

#### Movilidad progresiva.

Para evaluar la movilidad progresiva de los espermatozoides, se utilizó el método descrito por Kremer (45), determinando la distancia recorrida por las células en suspensión dentro de un capilar que contiene el medio de experimentación correspondiente a intervalos de tiempo de 30, -

60, 90, 120 y 180 minutos.

### Viabilidad.

#### Reactivos:

Reactivo A: Fosfato de sodio monohidratado 0.2 M

Reactivo B: Fosfato de sodio dibásico anhidro 0.2 M

Solución de hidróxido de sodio para ajustar pH.

Colorante azul de tripán al 0.1% en amortiguador de fosfatos 0.2 M pH 7.4. El amortiguador de fosfatos se preparó mezclando 14 ml del reactivo A más 36 ml del reactivo B aforando a 100 ml y ajustando a pH de 7.4.

#### Equipo:

Potenciómetro modelo Compensater E-388

Microscopio óptico Carl Zeiss K-17-11-Z.

#### Método.

La viabilidad de los espermatozoides se determinó de acuerdo al método propuesto por Toullet (46). De cada sistema de incubación se tomaron 50  $\mu$ l y se adicionaron 25  $\mu$ l del colorante azul de tripán se mantuvieron a 37°C por 5 minutos. Después de la interacción de los espermatozoides con el colorante, se valoró la viabilidad a tiempos variables desde 30 hasta 360 minutos mediante la observación -

de por lo menos 4 campos diferentes de las preparaciones correspondientes estimando el porcentaje de células vivas (no coloreadas) y el correspondiente a las células muertas (coloreadas) utilizando el microscopio óptico en contraste de fases con aumento seco fuerte.

### Descondensación.

#### Reactivos:

Solución fijadora pH 7.4:

2 gr. de paraformaldehído se disolvieron en 50 ml de agua bidestilada, a 60°C agregando 3 gotas de NaOH 1N y se dejó enfriar. Se agregaron 20 cc de glutaraldehído al 25%, 90 ml de cacodilato de sodio 0.2 M pH 7.3. Se aforó toda la mezcla a 200 ml con agua bidestilada, finalmente se ajustó a pH 7.4.

#### Fijación de la muestra:

Se tomó una alícuota de cada uno de los sistemas de incubación y se diluyó 1:3 con el fijador. Estas muestras se mantuvieron a temperatura ambiente durante 60 minutos e inmediatamente después se lavaron 3 veces con el amortiguador de cacodilato de sodio pH 7.3.

#### Método:



Para evaluar el grado de descondensación nuclear, de las suspensiones de espermatozoides fijados, se realizó a -- tiempos definidos de 30, 60, 90, 180, 240 y 360 minutos, -- tomando alícuotas adecuadas y contando las células con núcleos intactos (no descondensados) y las células con núcleos actuados (descondensados), en por lo menos tres campos diferentes de las preparaciones, utilizando el microscopio óptico Carl Zeiss en contraste de fases con filtro-verde de interferencia.

#### Consumo de Oxígeno.

La actividad respiratoria de los espermatozoides se determinó polarográficamente a 37°C usando un electrodo doble de plata/platino Modelo Clark YSI con membrana de 0.001" a un potencial constante de 0.8 v, el que a su vez está -- integrado a la cámara de respiración de 1.5 ml de capacidad.

De la poza de espermatozoides lavados se tomaron 3 alícuotas equivalentes cada una a  $10^8$  células y se incubaron durante 2 hrs., a 37°C en ausencia de heparina (control) y en presencia de heparina 20 y/o 40  $\mu$ M; inmediatamente después, los sistemas de incubación fueron centrifugados a -- 2000 rpm. durante 15 min. Los sobrenadantes se descartaron y los espermatozoides se resuspendieron en 0.3 ml de medio de fosforilación (47) e introducidos a la cámara --

de respiración para los registros del consumo de oxígeno. Después de los registros correspondientes al consumo basal, se adicionó como substrato exógeno succinato de sodio a una concentración final de 12 mM.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos respecto a la cuantificación de los lípidos después de que los espermatozoides fueron incubados en amortiguador de Krebs Ringer pH 7.4 durante 2 hrs. a 37°C en ausencia y en presencia de heparina 20 y 40  $\mu\text{M}$ , muestran claramente que los fosfolípidos permanecieron -- constantes aún en los espermatozoides que estuvieron en - contacto con la heparina. Bajo estas mismas condiciones- experimentales, las cantidades correspondientes al colesterol y a las relaciones colesterol/fosfolípidos sí se mo dificaron, siendo menores los valores correspondientes a los casos de tratamientos con heparina tabla No. 4.

Cuando las incubaciones fueron realizadas en presencia de heparina 20 y 40  $\mu\text{M}$  se produjo el desprendimiento de material protéico de los espermatozoides el cual fue libera do al medio de incubación. Este material al ser estudiado por electroforesis; reveló la presencia de una glico-- proteína con peso aproximado de 65, 000 Daltons. Esta -- glicoproteína no se observó en los geles correspondientes a los sobrenadantes de incubación en ausencia de la heparina figura No. 4.

Los resultados obtenidos en relación a la movilidad progre siva del espermatozoide, muestran un importante incremento de este parámetro cuando las células se incubaron en -

presencia de heparina 20  $\mu\text{M}$  y mayor aún cuando la concentración de heparina fue de 40  $\mu\text{M}$  comparados con los valores correspondientes a espermatozoides incubados en ausencia del glucosaminoglucano, Tabla No. 5.

Los experimentos realizados para estudiar la viabilidad de los espermatozoides después de 6 hrs. de incubación no mostraron diferencias en el número de espermatozoides viables; independientemente de la presencia de la heparina en el sistema de incubación. La descondensación del núcleo de los espermatozoides registrada a los 120 min. fue solamente del 5% y hasta del 50% a los 360 minutos de incubación en presencia de heparina 40  $\mu\text{M}$  Tabla No. 6.

Los espermatozoides lavados y preincubados durante 2 hrs. a 37°C en presencia de heparina 20 y 40  $\mu\text{M}$ , mostraron un consumo de oxígeno basal mayor en comparación con los valores registrados por los controles. Este mismo comportamiento fue observado cuando se adicionó a los espermatozoides succinato a una concentración de 12 mM lo cual podría ser indicativo de un aumento en la permeabilidad membranaral como consecuencia de la pérdida de colesterol inducida por la heparina. Tabla No. 7.

TABLA No. 4 CAMBIOS EN LA COMPOSICION LIPIDICA DEL  
 ESPERMATOZOIDE HUMANO INDUCIDOS POR LA HEPARINA.  
 EL NUMERO DE OBSERVACIONES ESTA INDICADO EN  
 PARENTESIS.

	COLESTEROL	FOSFORO	$\frac{\text{COLESTEROL}}{\text{FOSFORO}}$
CONTROL	$0.74 \pm 0.2$ (8)	$0.53 \pm 0.15$ (8)	$1.4 \pm 0.6$ (8)
HEPARINA (20 $\mu\text{M}$ )	$0.67 \pm 0.15^*$ (6)	$0.55 \pm 0.18$ (6)	$1.22 \pm 0.4^*$ (6)
HEPARINA (40 $\mu\text{M}$ )	$0.54 \pm 0.1^*$ (6)	$0.57 \pm 0.11$ (6)	$0.95 \pm 0.2^*$ (6)

Los números expresan valores promedio  $\pm$  la desviación estandar de las micromolas de colesterol o de fosfato/ $10^9$  - espermatozoides.

\*indica una diferencia significativa con valor de  $P < 0.001$  cuando los valores se compararon con los del grupo-control por la prueba de "t" de studen apareada.

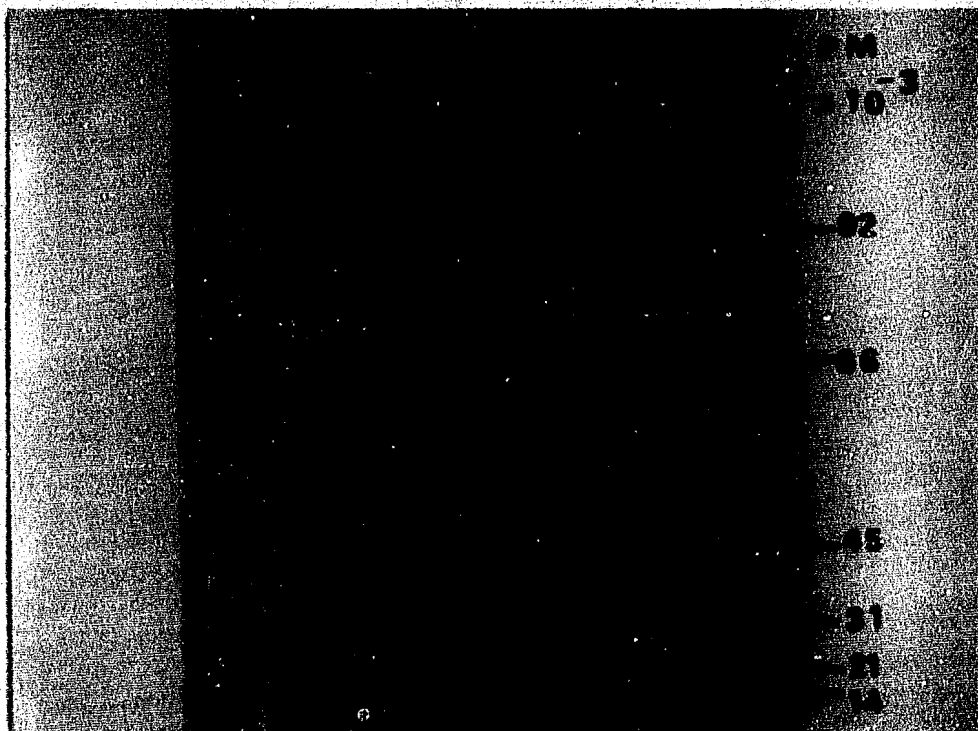


Figura No. 4 Electroforesis discontinua en geles de poliacrilamida 3 y 10%. Dodecil sulfato de sodio al 0.1% de los sobrenadantes después de 2 hrs. de incubación a 37°C.

A) en ausencia de heparina, B) en presencia de heparina 20  $\mu$ M, C) en presencia de heparina 40  $\mu$ M y D) estandares para pesos moleculares.

TABLA No. 5 CAMBIOS EN LA MOVILIDAD DEL ESPERMATOZOIDE  
HUMANO INDUCIDOS POR LA HEPARINA.

TIEMPOS EN MINUTOS	CONTROL	HEPARINA (20 $\mu$ M)	HEPARINA (40 $\mu$ M)
30	4.2 $\pm$ 1.0	6.4 $\pm$ 1.2	7.4 $\pm$ 1.5
60	6.1 $\pm$ 1.3	8.3 $\pm$ 2.0	10.7 $\pm$ 1.8
90	8.2 $\pm$ 2.1	12.4 $\pm$ 3.1	15.8 $\pm$ 3.2
120	11.4 $\pm$ 2.4	16.5 $\pm$ 3.4	21.6 $\pm$ 2.4
150	15.2 $\pm$ 2.7	22.1 $\pm$ 2.1	26.8 $\pm$ 2.2
180	18.3 $\pm$ 3.0	26.3 $\pm$ 3.3	33.5 $\pm$ 3.7

Los datos expresan los valores promedio  $\pm$  la desviación -  
estandar de la distancia (en mm) recorrida por los esper-  
matozoides. En todos los casos el número de observacio--  
nes fue de 5.



TABLA No. 6 VIABILIDAD Y DESCONDENSACION DEL NUCLEO DEL ESPERMATOZOIDE EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE HEPARINA. LOS VALORES ESTAN EXPRESADOS EN PORCIENTO.

TIEMPO EN MINUTOS	VIABILIDAD		DESCONDENSACION	
	CONTROL	HEPARINA (40 $\mu$ M)	CONTROL	HEPARINA (40 $\mu$ M)
30	90	86	0	2.0
60	85	84	0	3.0
90	84	82	0	3.0
120	82	80	0	5.0
180	80	78	0	7.0
240	79	76	0	15
300	78	76	0	30
360	78	75	3	50

Los números representan el valor promedio de 4 determinaciones.

TABLA No. 7 CONSUMO DE OXIGENO DE ESPERMATOZOIDES LAVADOS Y --  
PREINCUBADOS EN AUSENCIA Y EN PRESENCIA DE HEPARINA 20 Y 40  $\mu$ M--  
EL NUMERO DE CASOS ESTA INDICADO ENTRE PARENTESIS.

Condiciones Experimentales	Consumo Basal	Succinato (12 mM)
En ausencia de Heparina	$5.0 \pm 0.9$ (4)	$7.2 \pm 1.2$ (4)
En presencia de Heparina 20 $\mu$ M.	$6.5 \pm 1.2$ (4)	$9.4 \pm 2.3$ (4)
En presencia de Heparina 40 $\mu$ M.	$7.5 \pm 2.0$ (4)	$10.3 \pm 2.1$ (4)

Los números expresan el promedio  $\pm$  la desviación estandar de --  
las nanomolas de Oxígeno consumidas  $\times 10^8$  espermatozoides - - -  
 $\times \text{min}^{-1}$ .

**D I S C U S I O N**

De acuerdo a los conocimientos recientes, la capacitación del espermatozoide es un proceso en el que participan diferentes componentes que involucran cambios en los glicoconjugados en la superficie del espermatozoide, en los -- antígenos, en los lípidos, en las partículas intermembranales, en la fluidez membranar, en la permeabilidad a iones y a las moléculas pequeñas y en el metabolismo intermedio del espermatozoide ( 48, 49, 50, 51). Componentes del plasma seminal pueden evitar tanto la capacita-- ción como la reacción acrosomal (52). Independientemente del mecanismo involucrado, es obvio que la presencia del plasma seminal en el medio de fertilización no es deseaa-- ble. Es probable que parte de la capacitación sea la pér-- dida de macromoléculas del plasma seminal absorbidas en -- el espermatozoide durante la eyaculación (53, 54).

Uno de los primeros eventos que ocurren durante la capaci-- tación es la liberación de un glicoconjugado de la super-- ficie del espermatozoide, el cual puede inhibir la fija-- ción del espermatozoide capacitado a la zona pelúcida -- cuando es adicionado en los ensayos de fertilización in -- vitro. Este factor descapacitante puede ser liberado por la acción de fuerza iónica (55) o por la digestión con la B-N-acetilhexosaminidasa (56). Estos y otros resultados-- sugieren que los glicoconjugados adsorbidos en la super--

ficte del espermatozoide y que son liberados durante la -  
capacitación pudieran estar relacionados con la presencia  
de una glucoproteína en los medios de incubación solamen-  
te cuando los espermatozoides fueron incubados en presen-  
cia del mucopolisacárido a concentraciones de 20 y 40  $\mu$ M.  
De ser esto así podría pensarse que este primer cambio --  
inicia otros más a nivel de membrana, los que podrían es-  
tar relacionados con la disminución en los niveles de co-  
lesterol encontrada en nuestros experimentos; en este sen-  
tido es importante mencionar la acción inhibitoria de sus-  
pensiones que contienen colesterol sobre la capacidad fer-  
tilizante de espermatozoides de conejo capacitados en úte-  
ro. Por tanto parece ser necesaria la pérdida de coleste-  
rol del espermatozoide para propiciar la desestabilización  
de las membranas (57) así como los cambios propicios para-  
la penetración de la heparina la cual actuó descondensan-  
do la cromatina nuclear obteniéndose el mismo grado de --  
descondensación en ambas concentraciones 20 y 40  $\mu$ M. En  
nuestros experimentos fue necesario realizar pruebas de -  
descondensación del núcleo de los espermatozoides induci-  
da por la heparina para corroborar la actividad del mucopo-  
lisacárido sobre los espermatozoides y además para esta-  
blecer el tiempo de incubación necesario que permitiera -  
observar al microscopio óptico indicios de descondensa- -  
ción nuclear; lo cual era indicativo de que el mucopolisa

cárido ya había interaccionado con la superficie de los -  
espermatozoides.

En el presente trabajo se estudió como parámetro del meta-  
bolismo de los espermatozoides el consumo de oxígeno ob--  
servandose que la actividad respiratoria siempre fue ma--  
yor cuando las células fueron preincubadas en presencia -  
del glucosaminoglucano; lo cual explica en parte, el aumen-  
to de la movilidad progresiva de los espermatozoides obser-  
vada durante la incubaciones; así como la mayor respuesta  
respiratoria al adicionar succinato exógeno. Este compor-  
tamiento seguramente es propiciado por la disminución del  
colesterol membranal como lo demuestran nuestros resulta-  
dos. Esta disminución de colesterol no afectó la viabili-  
dad de los espermatozoides al menos hasta las 6 horas de-  
incubación.

De acuerdo a nuestros resultados es posible postular que-  
la heparina utilizada en las condiciones experimentales -  
descritas, parece estar actuando al menos parcialmente co-  
mo un inductor de la capacitación del espermatozoide huma-  
no eyaculado.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Singer, S.J., and Nicolson, G.L. (1972). The fluid-model of the structure of cell membranes. *Science*.- 175:720,731.
- 2.- Rouser, G., Nelson, G.J., Fleiseher, S., and Simon, G. (1963). In *Biological Membranes*. London, Academic. PP 5-7.
- 3.- Papahadjopoulos, D. and Kimelberg, H.K. (1973). Phospholipid vesicles (liposomes) as models for biological membranes. *Prog. Suf. Sci.*, 4:141-232.
- 4.- Thompson, T.T. and Henn, F.H. (1970). Experimental phospholipid model membranes, in *Membranes of mitochondria and chloroplast*. P.I, ed. Racker. Von Nostrand Reinhold, New York. 20-22.
- 5.- Deveaux, P., and Mc Connell, H.M. (1972). Lateral Diffusion in spin labeled phosphatidyl cholina multilayers. *J. Amer. Chem. Soc.* 94:4475-4481.
- 6.- Lee, A.G., Birdall, N.J.M. and Metcalfe, J.C. (1973). Measurement of fast lateral diffusion of lipids in vesicles and in biological membranes by H nuclear magnetic resonance. *Biochem.* 12:1650-1673.
- 7.- Shipley, G.G. (1973). Recent X ray diffraction studies of biological membranes. (Ed. Chapman, D. and Wallach, D.F.H) Academic Press, London, 2:1-90.
- 8.- Yguerabide, J., and Stryer, L. (1971). Fluorescence-spectroscopy of an oriented model membrane. *Proc. Nat. Acad. Sci USA.* 68:1217.1219.



- 9.- Davson, H. and Danielli, J.F. (1935). A contribution to the theory of permeability of thin membranes, *J. Cell. Comp. Physiol.* 5: 495-501.
- 10.- Robertson, J.D. (1959). The ultrastructure of cell membranes and their derivatives, *Biochem. Soc. Symp.* 16: 3-17.
- 11.- Guidotti, G. (1972). Proteins membrane, *Ann. Rev. -- Biochem.*, 41: 731-752.
- 12.- Singer, S.J. (1974). The molecular organization of membranes, *Ann. Rev. Biochem.*, 43: 805-833.
- 13.- White, I.G., Darin-Bennet A., Paulos, A. (1976). Lipids of human semen. In human semen and fertility - regulation in men. Ed. E.S.E. Hafez, C.V. Mosby Co, Saint Louis. pp 144-152.
- 14.- Paulos, A. and White, G.I. (1973). The phospholipid-composition of human spermatozoa and seminal plasma. *J. Reprod. Fert.* 35: 265-272.
- 15.- Hafez, E.S.E. (1983) In vitro fertilization (I.V.F.) en Proceeding of the Second Symposium on advances to pics in animal reproduction L. EL. Pinheiro and P.K. Basrur ed. Jaboticabal, S.P. Brazil.
- 16.- Reyes, A., Mercado, E., Goicoechea, B., Rosado, A. - (1976). Participation of membrane sulfhydryl groups in the epididymal maturation of human and rabbit - - spermatozoa. *Fertil Steril* 27:1452-1458.
- 17.- Rosado, A., Huacuja, L., Delgado, N.M., Hicks, J.J.-

- and Pancardo, R.M. (1975). Cyclic-AMP receptors in - the human spermatozoa membrane. *Life Sci.* 17:1707 - 1714.
- 18.- Chang, M.C. (1951). Fertilizing capacity of sperm - deposited in the fallopian tube. *Nature.* 168:697- - 698.
- 19.- Austin, C.R. (1951). Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust. J. Sci.- Res B* 4: 581-586.
- 20.- Edwards, R.G., Bavister, B.D., Steptoe, P.C. (1969)- Early stages fertilization in vitro of human oocytes matured in vitro. *Nature (london)* 22:622-635.
- 21.- Hamner, C.E., Jennings, L.L., Sojka, N.J. (1970). -- Cat (*Felis catus*, L) spermatozoa required capacita-- tion. *J. Reprod. Fertil.* 23: 477-480.
- 22.- Mahi, C.A., Yanagimachi, R. (1976). Maturation and - Sperm penetrarion of canin ovian oocytes in vitro. *J. Exp. Zool.* 196: 189-195.
- 23.- Brakett, B.G., Oliphant, G. (1975). Capacitation of- rabbit spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod.* 12:260--- 274.
- 24.- Gould, K.G., Cline, E.M., Williams, W.L. (1973). Ob- servations on the induction of ovulation and fertill<sub>i</sub> zation in vitro in the squirred monkey (*Saimiri sciurens*). *Fert, Steril.* 24: 260-268.

- 25.- Huacuja, L., Sosa, A., Delgado, M., Rosado, A. (1973).  
A Kenetic study of participation of zinc in human --  
spermatozoa metabolism. Life Sciences. 13: 1383-1394.
- 26.- Delgado, M., Huacuja. L., Pancardo, R., Merchant, O.,  
Rosado, A. (1976). Changes in the protein conformation  
of human spermatozoa membranes after treatmen whit -  
cyclic adenosine 3'-5'monophosphate and human follic-  
ular fluid. Fertility and Sterility. 27: 413-420.
- 27.- Ericsson, R.J., Buthala, D.A. (1971). Fertilization-  
of rabbit ova in vitro by sperm whit adsorbed sendai  
virus. Science. 173: 54-63.
- 28.- Brackett, B.G., Mills, J.A., Oliphant, G. (1972). --  
Preliminary efforts to capacitate rabbit sperm in vi-  
tro. Int. J. Fertil. 17: 86-89.
- 29.- Rosado, ALJ., Reyes, A., Blanco, I. (1974). Capacita  
tion in vitro of rabbit spermatozoa whit cyclic ade-  
nosine monophosphate and human follicular fluid. - -  
Fertility and Esterility vol. 25 No. 9: 821-824.
- 30.- Parrish, R.F., Wincek, T.J., Polakoski, K.L. (1980).  
Glycosaminoglycans stimulation of the in vitro conver  
sion of boar proacrosin into acrosin. J. Androl. - -  
1: 89-95.
- 31.- Delgado, N.M., Reyes, R., Huacuja, L., Carranco, A.,  
Merchant, H., Rosado, A. (1982b) Descondensation of-  
human sperm nuclei by glycosaminoglycan sulfate from  
sea urching egg. J. Exp. Zool. 224: 457-460.
- 32.- Guebaner, H., Lindner, H.E., Amsterdam, A. (1978). -

Synthesis of Heparin like glycosaminoglycans in rat-ovarian slices. Biol. Reprod. 18: 350-358.

- 33.- Yanahishita, M. Rodbard, D., Hascall, V.C. (1979) -- Isolation and characterization of proteoglycans from porcine ovarian follicular fluid. J. Biol. Chem. -- 254:911-920.
- 34.- Delgado, N., Huacuja, L., Merchant, H., Reyes, R., - Rosado, A. (1980). Species Specific descondensation of human spermatozoa nuclei by heparin. Arch. Androl. 4: 305-313.
- 35.- Delgado, N., Reyes, R., Huacuja, L., Merchant, H., - Rosado, A. (1982). Heparin binding sites in the human spermatozoa membrane. Arch. Androl. 8: 87-95.
- 36.- Capacitación del esperma humano por la heparina (1984) en prensa.
- 37.- Lenz, R.W., Bellin, M.E., Ax, R.L. (1983). Rabbit spermatozoa undergo an acrosome reaction in the presence of glucosaminoglucanos. Gamete Research. 8: 11-19.
- 38.- Zaneveld, L.J., and Polakoski, K.L. (1977). Collection and physical examination of the ejaculate. Techniques of human andrology, ed. by E.S.E. Hafez C. -- Elsevier/North-Holland. Biomedical. Press. 147-171.
- 39.- Belsey, M.A., Eliasson, R., Gallegos, A., Moghissi, K., Paulsen, C. and Prasad, M.R. (1980). Laboratory manual for examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. Pres Conser. Singapore. --

World Health Organization, Zwitter land. pp 11-12.

- 40.- Folch, J. Lees M., Sloane Stanley G.H. (1956). A -- simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem. 226: 497-504.
- 41.- Bottoger, C.J., Vant. Gent, C.M., Prices, C. (1961)- A rapid and sensitive sub-microphosphorous determination. Anal. Chim. Acta 24: 203-204.
- 42.- Ferro, P.V., Ham, A.B. (1960). Rapid determination - of total and free cholesterol in serum. Am. J. Clin. Pathol. 33: 545-553.
- 43.- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the Assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
- 44.- Fairbanks, G., Steck, T.L and Wallach, D.F. (1971) - Electrophoretic analysis of the mayor polipeptides - of human erithocyte membrane. Biochem. N.Y. 10: 2606-2617.
- 45.- Kremer, J. (1965). A simple sperm penetration test.- I.J. fertility. vol. 10 No. 3 pp 209-215.
- 46.- Toullet, F. and Voisin, G.A. (1973). Expermatoxic-espermagglutinating and cytotoxic activities of Guinea Pig autoantibodies to sperm. Autoantigent. J. -- Reprod. Fert. 37: 299-313.
- 47.- Chance B. Hagihara, B. (1961). Proceeding of the 5 -

th. International Congress on Biochemistry Moscon --  
p. 3 Pergamon London.

- 48.- Oliphant, G., Bracket, B.G. (1973). Immunological --  
assessment of surface changes of rabbit sperm under--  
going capacitation. Biol. Rep. 9: 404-414.
- 49.- Davis, B.K. (1981). Timing of fertilization in mammals  
sperm cholesterol/phospholipid ratio as a determinat  
of the capacitation interval. Proc. Natt. Acad. Sci.  
78: 7560-7564.
- 50.- Kinsey, E.H, Koehler, J.K. (1978). Cell surface - -  
changes associated with in vitro capacitation of ham  
ster sperm. J. Ultrastr. Res. 64: 1-13.
- 51.- Hicks, J.J., Pedrón, N., Rosado, A. (1972). Modifica  
tion of human spermatozoa glycolysis by cyclic adeno  
sine monophosphate (CAMP), estrogens and follicular-  
fluid. Fertil. Steril 23: 886-893.
- 52.- Kanwar, C.K., Yanagimachi, R., Lopata, A. (1979). --  
Effects of human seminal plasma on fertilizing capa-  
city of human spermatozoa. Fertil Steril 31: 321-327.
- 53.- Bedford, J.M, Chang, M.C. (1962). Removal of decapa-  
citation factor from seminal plasma by high-speed cen-  
trifugation. Am. J. Physiol. 202: 179-182.
- 54.- Davis, B.K. (1971). Macromolecular inhibitor of fer-  
tilization in rabbit seminal plasma. Proc. Natt. - -  
Acad. Sci. USA 68: 951-957.

- 55.- Oliphant G., Bracket, B.G. (1973). Capacitation of mouse spermatozoa in media with elevated strenglit - and reversible decapacitation whit epididymal extracts. Fertil. Steril 24: 948-955.
- 56.- Gwatkin, R.B., Anderson, O.F. (1973). Efects of glicosidase inhibition on the capacitation of hamster - spermatozoa by cumulus cells in vitro. J. Reprod. -- Fert. 35: 565-567.
- 57.- Bleau, G., Lalumiere, G., Chapdeline, A., Roberts, - K.D. (1975). Red surface structure stabilization by- cholesterol sulphate as evidenced by scannin electron microscopy. Biochim Biophys. A. 375: 220-223.