

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

**LA UBIQUITINACION DE LOS ESPERMATOZOIDES DURANTE SU PASO  
POR EL TRACTO REPRODUCTOR DE LA CONEJA.**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**ANGEL TOLEDANO OLIVARES**

**TUTOR:**

**DR. ALEJANDRO AVALOS RODRIGUEZ**

**COMITÉ TUTORAL:**

**DRA. MARCELA VERGARA ONOFRE**

**DRA. MARÍA DE LOURDES JUÁREZ MOSQUEDA**



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

A mi **Gran amigo** que en cualquier momento que lo necesito siempre esta para escucharme gracias por darme lo que tengo y ayudarme a levantarme cada vez que he caído

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

A la **FMVZ** de esta Universidad  
Por darme la oportunidad de realizar mi posgrado

A la **Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco**  
Por la donación del material biológico utilizado en este trabajo

Al **Dr. Alejandro Ávalos Rodríguez**  
Por tu amistad incondicional, por la gran confianza que me brindaste a pesar de mis deficiencias así por tu gran apoyo en los momentos de mi vida que se conjugaron en el transcurso de este trabajo que en momentos parecía imposible de alcanzar. Gracias Ale.

A la **Dra. María de Lourdes Juárez Mosqueda**  
Por su valiosa asesoría así como su amistad, paciencia y escucharme cuando a veces lo necesitaba.

A la **Dra. Marcela Vergara Onofre**  
Por su amistad, entusiasmo y apoyo brindado incondicionalmente

A la **Dra. Clara Ortega Camarillo**  
Por brindarme un momento de su valioso tiempo, para revisar esta tesis

A la **Dra. Maria Elena Trujillo Ortega**  
Por brindarme un momento de su valioso tiempo, para revisar esta tesis

A la **Dra. Ana María Rosales Torres**  
Por transmitir su pasión y empeño en la ciencia

Al Lic. **Ricardo Charvel Orozco**  
Por brindarme su amistad y apoyo para la realización de esta tesis

A todas las personas, sin excluir a ninguno. **Jesús, Fabiola, Alicia, Carolina, Israel, Vanesa, Adriana, Beatriz, Benito.** Gracias por los momentos que hemos pasado juntos, por permitirme conocerlos, ser parte de su vida

A **las personas** que de alguna manera siempre me han obstaculizado el querer salir adelante

## DEDICATORIAS

A mi Padre el **Sr. Pascual Toledano Olivares**

Papá: Se que no existen palabras con las que pueda algún día demostrarte mi agradecimiento te mereces mas que esto, por todo lo has hecho por mi, te mereces mis honores, mi cariño y respeto hoy mañana y siempre, gracias por haber creído en mi.

A mi Madre la **Sra. Rosa Olivares Nieto**

Gracias por todo tu apoyo, tu gran esfuerzo que solo una Mamá como tú lo puede dar así como el amor y la confianza que me depositaste desde el inicio de mi sueño, madre en este camino, vaya que me he caído pero no te he defraudado porque siempre me he levantado.

A mis Hermanos:

**Benito, Francisca, Rosalía, Fernando**

Quienes con su **Gran** apoyo en el momento que más lo necesite estuvieron conmigo, así como en lo económico, moral e impulsarme en todo momento para seguir adelante en el camino que un día me propuse.....Mil gracias

A los que forman parte de mi gran familia

**Baltazar, Lucia.** Gracias por su Gran apoyo

A ti **Carmen** y a **Nicolás Jesús**

Por ser parte fundamental en lo que realizo por su paciencia y apoyo incondicional e impúlsame en todo momento.

A la **Mra. Arcelia de la Roz Peña**

Por alentarme en todo momento a seguir en este camino

Al **MVZ. Jorge S. León Dousset**

Por su gran ayuda y apoyo incondicional

A **mis compañeros** de la ocho quienes me brindaron sin conocerme su protección apoyo y ayuda a levantarme a partir del momento en que llegue

A todos los maestros que he tenido en todo mi camino y a las personas que me ayudaron a subir este escalón Gracias.

# ÍNDICE

Página

<b>ÍNDICE</b> -----	v
<b>Índice de cuadros y figuras</b> -----	vii
<b>I.- Resumen</b> -----	viii
<b>II.- Abstract</b> -----	ix
<b>III.- Introducción</b> -----	1
<b>IV.- Antecedentes</b> -----	2
1.- Espermatozoide maduro-----	3
2.- Membrana plasmática del espermatozoide-----	4
3.- El paso de los espermatozoides por el tracto reproductor de la coneja-----	7
3.1.- Transporte a través del cervix-----	8
3.2.- Transporte a través del útero-----	8
3.3.- Transporte a través de la unión uterotubal- -----	9
3.4.- Transporte a través del oviducto - -----	9
4.- Capacitación espermática-----	10
5.- Sistema de degradación por ubiquitina-----	14
5.1.- Reconocimiento del sustrato-----	16
<b>V.- Planteamiento del problema</b> -----	17

<b>VI.- Hipótesis</b>	18
<b>VII.- Objetivo general</b>	18
<b>VIII.- Objetivos específicos</b>	18
<b>IX.- Material y métodos</b>	19
Obtención de muestras	19
Obtención de espermatozoides del tracto reproductor de la coneja	19
Detección de ubiquitina en los espermatozoides obtenidos del tracto reproductor de la coneja	20
<b>X.- Resultados</b>	21
<b>XI.- Discusión</b>	24
<b>XII.- Conclusiones</b>	30
<b>XIII.- Literatura citada</b>	30

## ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura básica de los espermatozoides maduros-----	3
<b>Figura 2.</b> (a) Principales componentes (b) dominios del espermatozoide maduro -----	4
<b>Figura 3.</b> Esquema para mostrar la degradación de una proteína blanco por el proteosoma -----	17
<b>Fig. 4.</b> Fluorescencia de los espermatozoides ubiquitinados de los eyaculados, grupo control.-----	22
<b>Fig. 5.</b> Espermatozoides ubiquitinados en el tracto reproductor de la hembra sacrificadas 5 horas después de la monta.-----	24
<b>Grafica 1.</b> Cantidad total de espermatozoides localizados en el eyaculado así como en las diferentes regiones del tracto reproductor de la coneja.- -----	21
<b>Grafica 2.</b> Porcentaje de espermatozoides ubiquitinados en el eyaculado así como en las diferentes regiones del tracto reproductor de la hembra -----	23

## I.- RESUMEN

El objetivo de este estudio fue conocer si ocurre ubiquitinación en las proteínas de la membrana plasmática de los espermatozoides de conejo durante su tránsito por el tracto reproductor de la hembra, para lo cual se utilizaron conejos Nueva Zelanda blancos (4 machos y 5 hembras) ambos sexualmente maduros con fertilidad probada y una edad de entre 12-24 meses, a los machos se les realizó un espermograma clásico, donde se valoró porcentaje de espermatozoides vivos, movimientos progresivos y concentración, a las hembras se les dio monta natural y 5 horas después se sacrificaron por dislocación cervical. Se disecó el tracto reproductor y se ligo con hilo de algodón cada una de las tres regiones anatómicas vagina, útero y oviducto, se les realizó un lavado con solución PBS y se cuantificó el total de espermatozoides en cada región. Los resultados obtenidos fueron: en la vagina se encontró un total de  $42 \pm 15 \times 10^6$ , en el útero  $12 \pm 8 \times 10^6$  y en oviducto  $0.70 \pm 0.10 \times 10^6$  y el porcentaje de espermatozoides con proteínas ubiquitinadas se cuantificó mediante la técnica inmunoensayo (SUTI) usando el anticuerpo Ub (P4D1), para lo que se utilizó un microscopio de fluorescencia. Dentro de los resultados obtenidos no se encontró diferencia estadística significativa con ( $P < 0.05$ ) en el porcentaje de espermatozoides ubiquitinados en las diferentes regiones anatómicas del tracto reproductor de la coneja, sin embargo si se encontró una diferencia en el patrón de fluorescencia de los espermatozoides ubiquitinados, el patrón de fluorescencia encontrado en los espermatozoides ubiquitinados en la vagina fue una fluorescencia de la parte media, en el útero y oviducto se encontró la fluorescencia en la parte media así como en la parte del acrosoma en su porción anterior.

**Palabras clave:** Ubiquitina, espermatozoide, proteína, capacitación



## II.- ABSTRACT

The aim of this study was to determine if it happens ubiquitin proteins in the cell membrane of rabbit sperm during its transit through the female reproductive tract, which used New Zealand white rabbits (4 males and 5 females) both sexually mature with proven fertility and age between 12-24 months, the males are espermograma underwent a classic, which I appreciate percentage of live sperm cells, progressive movements and concentration, females were given natural and 5 hours later were slaughtered by cervical dislocation. We dissected the reproductive tract and is linked with cotton yarn each of the three regions anatomical vagina, uterus and oviduct, it underwent a washing solution with PBS and quantified the total number of sperm in each region. The results were in the vagina was found a total of  $42 \pm 15 \times 10^6$ , in uterus  $12 + 8 \times 10^6$  and  $\times 10^6$  oviduct  $0.70 + 0.10$  and the percentage of sperm proteins with ubiquitin is measured by immunoassay technique (SUTI) using antibody Ub (P4D1), which is using a fluorescent microscope. Within the results were not found significant statistical difference ( $P < 0.05$ ) in the percentage of sperm ubiquitin in different anatomical regions of the reproductive tract of the rabbit, but if they found a difference in the pattern of fluorescence of sperm ubiquitin, the pattern of fluorescence found in ubiquitin sperm in the vagina was a fluorescence of the middle part, in the uterus and oviduct will encounter fluorescence in the middle as well as part of the acrosome in its portion above.

Key words. Ubiquitin, esperm, proteín, capacitation

### III.- INTRODUCCION

Estudios recientes sobre la eliminación de los espermatozoides defectuosos o con alteraciones no visibles al microscopio óptico y que recaen en modificaciones a las proteínas de superficie, proponen que éstos son eliminados por un mecanismo fisiológico que marca a las proteínas alteradas con ubiquitina (Ub) para su posterior eliminación, a este mecanismo se le conoce como ubiquitinación, el cual ocurre en diversos eventos biológicos y sistemas celulares, entre los que se incluyen al epitelio del útero y oviducto durante la menstruación (Bebington *et al.*, 1999a, 2000b), así como en el espermatozoide; fenómeno que puede ser tomado como un indicador de la integridad espermática. En varias especies de mamíferos incluyendo el humano, la infertilidad en el macho ha sido asociada con un contenido mas alto de ub en las proteínas de la membrana plasmática del espermatozoide (Sutovsky *et al.*, 2001a, b). Las proteínas parecen ser marcadas por ubiquitina secretada por el epitelio epididimario (Santamaria *et al.*, 1993; Fraile *et al.*, 1996) y se unen de manera preferencial a la superficie de los espermatozoides que presentan algún defecto (no siempre detectado por un espermograma) (Sutovsky *et al.*, 2001b), y al parecer cuando estos pasan por el cuerpo y cola del epidídimo estos son fagocitados por las células claras del epitelio epididimario (Hermo *et al.*, 1988). Aunque, no se conoce con precisión la participación del proceso de ubiquitinación en las diferentes etapas del desarrollo espermático, se tienen algunas evidencias de su participación en la gametogénesis (Baarends *et al.*, 1999b) así como en muchos otros procesos.

Sutovsky *et al.*, 2001b demostró que los espermatozoides defectuosos de toros domésticos, ganado salvaje (búfalos y gaur), monos *reshus*, humanos y ratones presentan un alto índice alto de ubiquitinación en su superficie. Al parecer un abrupto incremento en el número de espermatozoides ubiquitinados durante su paso entre la rete testis a la cabeza del epidídimo (Sutovsky *et al.*, 2001b). La ubiquitina se expresa en el epitelio epididimal y se acumula en la corteza de las microvellosidades, un sitio que posee propiedades de secreción apócrina de

proteínas. Esto permite suponer que la ubiquitinación de las proteínas de la superficie del espermatozoide pueda ser el medio de inmovilización y/o reabsorción de espermatozoides defectuosos durante su paso por el epidídimo. Además, como el mecanismo propuesto señala que un cierto porcentaje de espermatozoides ubiquitinados o defectuosos estén presentes en el eyaculado, la presencia de ubiquitina en la superficie de los espermatozoides podría ser un excelente marcador de calidad de semen tanto en humanos como en animales (Sutovsky *et al.*, 2001b). Para el establecimiento de la ubiquitina como un biomarcador de infertilidad humana, Sutovsky *et al.*, (2004), realizaron un estudio en el cual examinaron la relación entre el contenido de ubiquitina en los espermatozoides y los parámetros clásicos de un espermograma de varones de una población clínicamente infértil por diferentes etiologías. Para lo cual utilizaron un anticuerpo anti ubiquitina de humano (KM691), y. Este grupo encontró que los pacientes infértiles (n=28) mostraron valores altamente significativos de espermatozoides ubiquitinados. Concluyendo que el incremento en la ubiquitinización está inversamente relacionado con la cuenta espermática, la motilidad y el porcentaje de anomalías morfológicas. Estos resultados sustentan el uso de la ubiquitina como un biomarcador de calidad del semen humano y sugieren su uso en otras especies. (Sutovsky *et al.*, 2004).

#### **IV.- ANTECEDENTES**

La fecundación en los mamíferos depende de que la estructura y funcionalidad de los gametos participantes sea adecuada. Esto está garantizado a varios niveles. Incluyéndose la selección de los espermatozoides capacitados por el vitelo del ovocito durante la fecundación, así como una preselección tanto del espermatozoide como del ovocito antes de su liberación desde las gónadas.

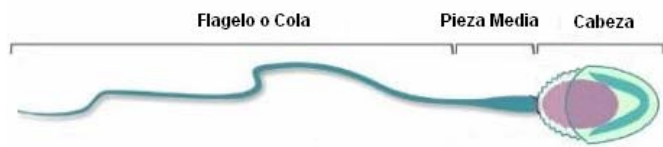
La infertilidad del macho esta asociada, a defectos en la membrana del espermatozoide, factores ambientales y genéticos, así como a un contenido de proteínas en la membrana plasmática, que son detectadas por anticuerpos anti-

ubiquitina. Estas proteínas que son marcadas por ubiquitina parecen ser secretadas por el epitelio epididimario y se unen de manera preferencial a la superficie de los espermatozoides que presentan algún defecto (no siempre detectado por un espermograma) y al parecer cuando estos pasan por el cuerpo y cola del epidídimo algunos de estos son fagocitados por las células epiteliales del epidídimo (Sutovsky *et al.*, 2004).

### 1.- El espermatozoide maduro

La estructura básica de los espermatozoides maduros ha sido dividida en tres regiones altamente especializadas (ver figura 1). **La Cabeza**, representa la parte más voluminosa y anterior de la célula. Esta directamente involucrada en los mecanismos de interacción entre espermatozoide y ovocito durante la fecundación. En la cabeza se encuentran el núcleo y el acrosoma contiene y poco citoplasma. El acrosoma es una vesícula compleja que contiene enzimas hidrolíticas, necesarias para la penetración de la zona pelúcida (ZP) del ovocito por el espermatozoide. **La pieza media**, en la cual se localizan las mitocondrias, encargadas de la producción de energía. **El flagelo**, que le da la movilidad (Frits *et al.*, 2000).

**Figura 1.** Estructura básica de los espermatozoides maduros



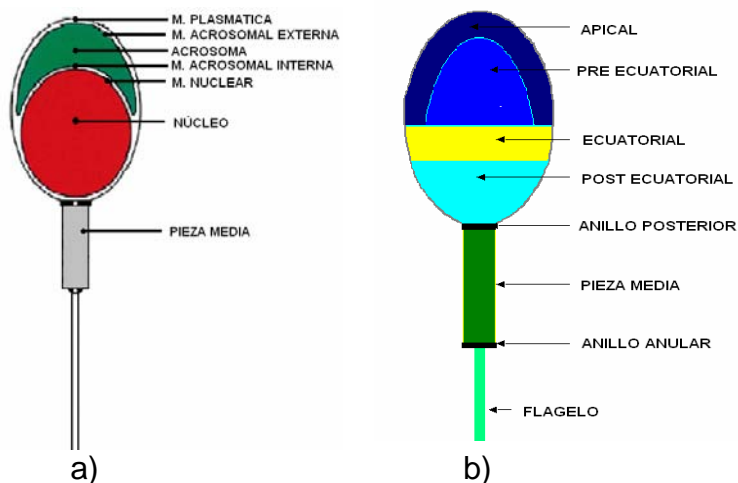
Olivera *et al.*, 2006

## 2.- Membrana plasmática del espermatozoide.

La membrana plasmática del espermatozoide se caracteriza por estar subdividida en regiones bien delimitadas a pesar de la reconocida capacidad de la membrana plasmática para la migración lateral de proteínas y lípidos. Estas regiones denominadas dominios difieren notablemente en composición y función. (Figura 2) (Frits *et al.*, 2000).

La membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide está dividida en un dominio acrosomal (región anterior de la cabeza) y en un dominio postacrosomal (región posterior a la cabeza). El dominio acrosomal puede ser subdividido en segmento marginal (segmento apical, banda anterior y/o aro periférico), dominio que se encuentra sobre el área del acrosoma que sobresale de la región nuclear, segmento principal (segmento acrosomal) dominio localizado por encima de la mayor porción del acrosoma y dominio ecuatorial (acrosomal posterior) ubicado en los límites entre la parte posterior del acrosoma y la llamada región posacrosomal. El dominio marginal y el segmento principal, a menudo son referidos como acrosoma anterior o como capa anterior. Estos dos dominios están separados por una media luna central en el caso de espermatozoides de cobayo y posiblemente de otras especies (Yanagimachi, 1994; Frits *et al.*, 2000).

**Figura 2.** (a) Principales componentes (b) dominios del espermatozoide maduro



Frits *et al.*, 2000

Los principales componentes del espermatozoide son la cabeza, pieza media y cola, en la cabeza se encuentra la membrana plasmática, la acrosomal externa, la acrosomal interna, el acrosoma, la cubierta nuclear y el núcleo. La membrana plasmática del espermatozoide se caracteriza por estar organizada en dominios y los principales dominios son: la región apical, la pre ecuatorial, ecuatorial, post ecuatorial, anillo posterior, pieza media, anillo anular y flagelo (Frits *et al.*, 2000).

La membrana plasmática del espermatozoide está compuesta de colesterol, glicolípidos, altas cantidades de plasmalógenos, fosfolípidos y otros lípidos de cadena alifática poliinsaturada. Los fosfolípidos forman las dos terceras partes del total de los componentes lipídicos de la membrana plasmática del espermatozoide. Los esteroides son los segundos lípidos más abundantes en el espermatozoide (Frits *et al.*, 2000). Estudios realizados por criofractura muestran que en los espermatozoides de cobayo y de toro, la cantidad de esterol en la parte anterior del acrosoma es 4 veces mayor que la encontrada en la región postacrosomal. Aunque el sulfato de colesterol es una pequeña parte del esterol total, es un componente importante en el dominio acrosomal de la membrana plasmática del espermatozoide humano (Yanagimachi, 1994).

La relación fosfolípidos / proteína de la membrana plasmática del espermatozoide de cerdo es de 0.68 en base al peso, sugiriendo que la cantidad de proteínas y lípidos en la membrana es aproximadamente la misma, aunque es posible que la relación proteína / lípidos en varios dominios de la membrana plasmática del espermatozoide sea diferente. (Yanagimachi, 1994; Frits *et al.*, 2000).

Aunque hay variación considerable entre las diferentes especies de mamíferos, la membrana plasmática contiene en promedio 70% de fosfolípidos, 25 % de lípidos neutros y 5 % de glicolípidos (en base molar) (Mann y Litwak-Mann, 1981; Frits *et al.*, 2000).

Los fosfolípidos pueden ser divididos en dos grupos: glicerofosfolípidos y esfingolípidos. Los glicerofosfolípidos varían en estructura molecular porque la cabeza de su grupo polar es diferente, en la posición sn-3 del esqueleto del

glicerol. Cada clase de fosfolípido contiene diferentes cadenas alifáticas tales como acil, alquil, alquenil, que pueden estar unidas a la posición sn-1 o sn-2 del esqueleto del glicerol (Parks y Hammerstedt, 1985). Las concentraciones de fosfolípidos en la membrana plasmática de las células espermáticas, son generalmente comparables a los de las membranas plasmáticas de las células somáticas. Por ejemplo, el espermatozoide humano contiene una relación porcentual de 50 de fosfatidilcolina, 30 de fosfatidiletanolamina, 12.5 de esfingomiélin, 3 de fosfatidilserina, 2.5 de cardiolipina y casi 2 de fosfatidilinositol. Por el contrario, la composición estructural de especies moleculares de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, así como de otros fosfolípidos, es considerablemente diferente entre los espermatozoides y las células somáticas (Frits *et al.*, 2000). La posición sn-2 del esqueleto del glicerol de los fosfolípidos espermáticos constituye una de las diferencias más notables en cuanto a la esterificación con ácidos grasos poli insaturados de cadena larga (casi exclusivamente ácido docosahexaenóico 22:6 y ácido docosapentaenóico, 22:5), además en la posición sn-1 contienen predominantemente cadenas alifáticas saturadas de 16 átomos de carbono de los cuales casi el 55 % está unido a un vinileter (plasménicolina o plasméniletanolamina) y 25 % con un grupo alquilo saturado (fosfatidilcolina o fosfatidiletanolamina) (Evans *et al.*, 1980; Brouwers, 1998), solo el 20 % de la fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina contienen en el sn-1 un enlace de tipo éster con un ácido graso. Durante la capacitación la cantidad de fosfatidilcolina pueden aumentar debido a la metilación de la fosfatidiletanolamina (Frits *et al.*, 2000).

Existen variaciones entre espermatozoides de diferentes especies, en cuanto a la concentración de lípidos neutros que componen su membrana plasmática, incluso hay diferencias entre espermatozoides del mismo individuo. El principal componente que varía, es el colesterol. El espermatozoide humano contiene una alta concentración de colesterol (40% del total de lípidos en base molar), sin embargo el cerdo contiene mucho menor cantidad (22% del total de lípidos base molar). Además de colesterol, el demosterol, sulfato de colesterol y ésteres de

colesterol también están presentes en la membrana (Mann y Lutwak-Mann, 1981; Frits *et al.*, 2000).

### **3. EL PASO DE LOS ESPERMATOZOIDES POR EL TRACTO REPRODUCTOR DE LA CONEJA.**

El transporte de los espermatozoides a través del tracto reproductor femenino y más específicamente durante el tránsito por el útero y oviducto, es un proceso complejo. Durante la inseminación natural o artificial en la mayoría de los mamíferos, millones de espermatozoides son depositados en la vagina o útero dependiendo de la especie, con la comitiva de fertilizar uno o varios ovocitos (Suarez y Pacey, 2006). En algunas especies los espermatozoides pueden permanecer viables por días como en el caso de la yegua, vaca y cerda o incluso meses en algunas especies de murciélagos. En el humano hay evidencias de que la fertilización ocurre en el transcurso de los cinco días después de la ovulación (Wilcox *et al.*, 1995). Dentro del tracto reproductor de la hembra los espermatozoides están expuestos a diversos daños debidos en primera instancia a las contracciones uterinas y en segunda, las defensas del sistema inmune por constituirlos como cuerpos (Menge y Edwards, 1993). Así los espermatozoides deben de mantener su fertilidad a pesar de estos obstáculos. De tal forma que de los millones de espermatozoides depositados durante el apareamiento, solo unos miles llegan al oviducto, y normalmente, solo un espermatozoide fertiliza un ovocito (Suarez y Pacey, 2006).

En la coneja, la deposición del semen induce una invasión de neutrofilos que toma tiempo para llegar a un nivel efectivo dentro de la vagina. Si bien a pesar de los leucocitos, que pueden fagocitar incluso espermatozoides. En estudios anteriores la recuperación de espermatozoides en la coneja después de 3-24h postmonta en la vagina (Phillips y Mahler, 1977a,b). Sin embargo Overstreet *et al.*, 1978 encontraron ya localizados miles (20.000) de espermatozoides se en oviducto.



### **3.1. Transporte a través del cervix**

Dentro del cervix por el contrario el moco cervical si representa una barrera para espermatozoides anormales, debido a que presentan un pobre perfil hidrodinámico en comparación con los espermatozoides que tienen adecuada motilidad y un movimiento vigoroso; así este puede ser considerado como un medio de selección de los espermatozoides (Hanson y Overstreet, 1981; Barros *et al.*, 1984).

Al igual que la vagina, el cervix puede presentar una respuesta inmune. En la coneja y en la mujer la inseminación de los espermatozoides estimula la migración de leucocitos, particularmente neutrofilos y macrófagos dentro del cervix. (Tyler, 1977; Pandya y Cohen, 1985).

En la coneja se encuentra una infiltración cervical dentro de la media hora después de la monta o inseminación artificial (Tyler, 1977), a pesar de esta respuesta mediada por leucocitos y neutrofilos, los espermatozoides pueden migrar a través del moco cervical, por lo que los leucocitos no representan una respuesta significativa para los mismos (D' Cruz *et al.*, 1992), y se ha propuesto que los leucocitos sirven solamente como protección contra microorganismos que pudieran acompañar a los espermatozoides (Suarez y Pacey, 2006).

### **3.2. Transporte a través del útero**

Este transporte se da principalmente por las contracciones del músculo liso del miometrio las que son incrementadas durante la fase folicular. En la mujer estas contracciones ocurren durante el periodo pre ovulatorio y son limitadas a la capa del miometrio localizada por debajo del endometrio, en contraste a las contracciones que ocurren durante la menstruación, donde se involucran todas las capas del miometrio (Lyons *et al.*, 1991; de Ziegler *et al.*, 2001). De acuerdo a investigaciones realizadas con ratas macho vasectomizadas las contracciones pueden ser estimuladas por los componentes del líquido seminal (Crane y Martin

en 1991). Claus,1990 indica que en verracos los estrógenos contenidos en el plasma seminal incrementan las contracciones miométricas.

El transporte rápido de espermatozoides en el útero, por la actividad miométrica, puede incrementar a la supervivencia de los espermatozoides al ayudar a los a pasar las defensas inmunológicas de la hembra.

Como en el caso de la vagina y cervix, la monta en la cavidad uterina induce una infiltración leucocitaria, (leucocitos y neutrofilos) llegando a su punto máximo después de varias horas del apareamiento. (Suarez y Pacey, 2006).

Cuando entran los primeros espermatozoides al útero, estos son más numerosos que los leucocitos. Con el paso del tiempo, los leucocitos llegan a ser más numerosos que los espermatozoides. En este momento como los espermatozoides han perdido la protección que les da el plasma seminal son más susceptibles al ataque por los leucocitos. Por lo que es importante que su paso a través de la cavidad uterina ocurra antes de que un número importante de leucocitos arribe (Suarez y Pacey, 2006).

### **3.3.- Transporte a través de la unión uterotubal**

Esta unión presenta barreras anatómicas y fisiológicas así como una mucosa al paso de espermatozoides en la mayoría de los mamíferos.

La entrada es muy sencilla en el ser humano; mientras que en otros mamíferos conejos, vacas, cerdos, y otras especies es complicada, por pliegues y la mucosa, esta disposición de los pliegues parece diseñada para atrapar a los espermatozoides para evitar su trancito. (Wrobel *et al.*, 1993).

### **3.4.- Transporte a través del Oviducto**

Cuando los espermatozoides atraviesan la unión útero tubal y entran al conducto inicial del oviducto (istmo), estos son atrapados y retenidos en un reservorio

(Yanagimachi y Chang, 1963) quienes fueron los primeros en describir un reservorio de espermatozoides en el hámster posteriormente en especies como el ratón (Suarez, 1982), conejos (1973; Overstreet *et al.*, 1978), vacas (Hunter y Wilmut, 1984), cerdos (Hunter, 1981) y oveja (Hunter y Nichol, 1983), por lo que el oviducto provee un refugio para los espermatozoides. A diferencia de la vagina, cervix y útero, y así poder mantener la fertilidad de los espermatozoides hasta la ovulación. Se ha propuesto también que el almacenamiento de los espermatozoides en el istmo sirve para prevenir la polispermia al momento de la fecundación, para poder permitir que solo unos pocos espermatozoides lleguen a tiempo de la llegada del ovocito a la ámpula.

En los mamíferos estudiados la unión del espermatozoide esta sobre radicales de carbohidratos en el epitelio. Estos sitios de unión fueron localizados en la parte acrosómica de los espermatozoides, que es la región en la que los espermatozoides se unen al epitelio (DeMott *et al.*, 1995), recientemente Reeve *et al.* (2003) han implicado la secuencia de aminoácidos Arg-Gly-Asp en espermatozoides unidos al istmo pero no al epitelio ampular.

#### **4.- CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA**

La superficie de los espermatozoides maduros presenta regiones con diferentes propiedades bioquímicas y/o funcionales que participan específicamente en eventos como la capacitación y la reacción acrosomal (RA). 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).

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 membrana plasmática (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; 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 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; 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 hiperactivación del espermatozoide, ha quedado demostrada en el cobayo, el ratón y el 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 *et al.*, 1993, 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 complicado y a pesar de que ha sido estudiada aún no se tiene un conocimiento preciso de los mecanismos que ocurren de manera fisiológica. Los cambios a nivel de la MP del espermatozoide que se inducen durante la capacitación 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, 1957) 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 y Garde, 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 hasta la región del ampulla, 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). Durante la capacitación se ha encontrado una disminución en la cantidad de colesterol y una disminución en la relación molar colesterol/fosfolípidos (c/f) (Ren *et al.*, 2001; Quill, *et al.*, 2003).

Langlais, *et al.*, 1981, 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  $\text{Ca}^{2+}$ . El  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular es requerido para completar la capacitación, acontecimiento que preceden a la RA (Fraser, *et al.*, 1993).

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). Aparentemente estos factores descapacitantes actúan en la MP bloqueando receptores, grupos funcionales, enzimas, mecanismos o canales de intercambio iónico. Entre sus funciones se 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 (Yanagimachi, 1994).

El  $\text{NaHCO}_3$  juega un papel importante en la inducción de capacitación *in vitro* de las células espermáticas (Visconti *et al.*, 1995). En los espermatozoides de cerdo, el  $\text{NaHCO}_3$  modifica la superficie de la MP, incrementa el desorden lipídico (Harrison., 1996), aumentando la afinidad de unión hacia la ZP (Harkeman *et al.*, 1998) y el movimiento de transporte de fosfolípidos en la bicapa de la región apical del espermatozoide (Gadella y Harrison., 2000, 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), (de Vries *et al.*, 2003).

Se ha encontrado que el  $\text{NaHCO}_3$  directamente activa a la adenilato ciclasa (AC) e induce la formación del adenosin monofosfato cíclico (cAMP), el cual a su vez activa a la proteína cinasa A (PKA) (Chen *et al.*, 2000), esta cascada de señalización modifica la arquitectura de la MP del espermatozoide.

Es decir el papel del cAMP como segundo mensajero es activar a PKA induce la fosforilación de proteínas celulares específicas en el espermatozoide del 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).

Por otra parte, 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. Se menciona que 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 las proteínas integrales y los glicolípidos.

El glicocálix se altera durante la capacitación del espermatozoide, como fue mostrado por estudios con lectinas (Yanagimachi, 1994). La redistribución de glicolípidos durante la capacitación se atribuye a la liberación de factores descapacitantes (Adeoya-Osiguwa y Fraser, 1993) y otros factores que se unen a la MP (Topfer-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).

## **5.- SISTEMA DE DEGRADACION POR UBIQUITINA**

En el sistema de degradación participan diferentes componentes como ubiquitina, enzimas E1, E2, E3 y proteosomas (ver figura 3).

La ubiquitina (Ub) es una proteína de 76-residuos de aminoácidos (Schlesinger *et al.*, 1975) ésta posee una de las secuencias más conservadas entre las especies (Jentsch *et al.*, 1991). La estructura globular y compacta de la Ub la puede proteger de la proteólisis durante la degradación de las proteínas ubiquitinadas, mientras su carboxilo terminal, se extiende desde el cuerpo de la proteína, lo que permite su interacción con las proteínas blanco (Vijay-Kumar *et al.*, 1987).

Para que los proteosomas puedan degradar a las proteína es necesario que a dicha proteína blanco se le adhiera una cadena múltiple de Ub. La ubiquitinación es un proceso multienzimático que genera un enlace isopeptídico entre el grupo alfa carboxilo terminal de la glicina de la Ub y el grupo amino de una lisina de la proteína blanco (Chau *et al.*, 1989; Ciechanover *et al.*, 2000). Adicionalmente pueden formarse enlaces isopeptídicos Ub-Ub entre el carboxilo terminal de otra Ub y el grupo amino (lisina 48) de la Ub unida. Esto puede continuar hasta que se forma una cadena de más de 20 unidades (Hershko y Ciechanover *et al.*, 1998).

La ubiquitinación comienza con la activación de la Ub dependiente de ATP, para formar el complejo Ub-adenilato-E1, donde la enzima E1 es una enzima activadora de Ub (UbA) (Ciechanover *et al.*, 1982). La ubiquitina es después transferida hacia un residuo de cisteína en la enzima E1 para formar un complejo enzima-Ub-tiol-éster (Haas y Rose., 1982).

La Ub activada es después transferida a un sitio activo de residuos de cisteína dentro de la enzima E2 (también conocida como Ub transportadora/conjugadora o enzima UbC: (Hershko *et al.*, 1983; Haas y Rose, 1982; Jentsch *et al.*, 1990). En contraste a las enzimas E1, existen varios tipos de enzimas E2 dentro de cada célula (Hershko *et al.*, 1983; Pickart y Rose, 1985; Sung *et al.*, 1990). Todas las enzimas E2 conocidas, poseen la secuencia homóloga UbC, la cual contiene un residuo de cisteína esencial para su actividad (Jentsch *et al.*, 1990; Sung *et al.*, 1990). La ubiquitina pasa de la enzima E2 a la proteína blanco directamente o mediante una tercer enzima.

Las enzimas E3 (Ub unión/reconocimiento) no siempre son necesarias para la ubiquitinación, al menos *in vitro*, especialmente si la enzima E2 es específica para el sustrato (Ciechanover *et al.*, 1982); se ha postulado que pueden existir una gran variedad de enzimas E3, cada una con un sustrato específico. Algunas enzimas E3 pueden unirse al mismo tiempo a la enzima E2 y a la proteína blanco y promover la transferencia de la Ub, formando así la unión isopeptídica con la proteína blanco. Sin embargo, algunas enzimas E3 están directamente



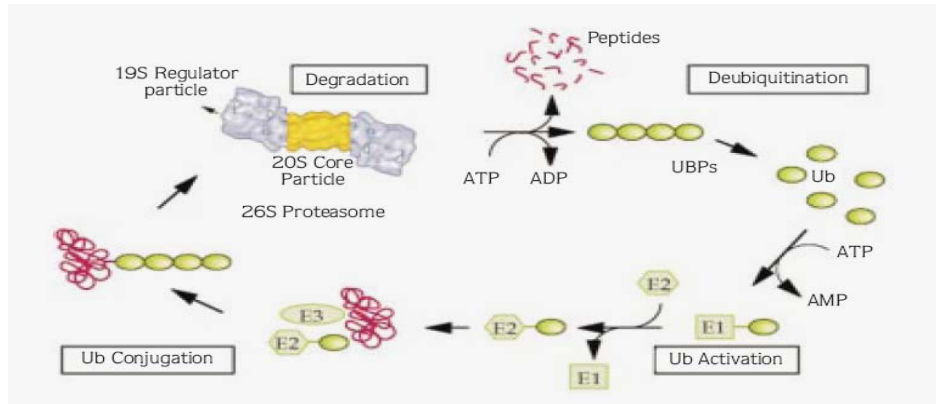
involucradas en la transferencia de Ub, a través de la aceptación de Ub desde una enzima E2 para formar un enlace tiol-éster y comenzar la donación a la proteína blanco (Hershko y Ciechanover; 1998). Recientemente, se han descubierto factores adicionales involucrados en la formación de cadenas de multi-Ub en las proteínas blanco (enzimas E4) (Koegl *et al.*, 1999).

### **5.1.- Reconocimiento del sustrato**

La presencia de un residuo de lisina es necesaria, pero no suficiente para la ubiquitinización de las proteínas blanco. Además parece ser que las proteínas deberán contener un “DEGRON” (sitio) o una marca la es reconocida por elementos del sistema Ub (Varshavsky, 1991), para que ocurra la ubiquitinización. Uno de los “DREGON”, podría ser el residuo amino terminal de la proteína (Hershko *et al.*, 1984; Bachmair *et al.*, 1986)

El proteosoma 26S es un complejo de proteasas citosólico y nuclear, que degrada proteínas ubiquitinadas (Hough *et al.*, 1987; Ganoth *et al.*, 1988). El proteosoma 26S consiste de un centro catalítico muy particular llamado proteosoma 20S que consta de 4 anillos empaquetados, de 7 subunidades cada uno y es cubierto en uno o ambos extremos por un complejo regulador 19S, que le confiere especificidad para los sustratos ubiquitinados en el proteosoma. Mientras que este se encarga de la degradación de proteínas ubiquitinadas (Voges *et al.*, 1999). Después de la proteólisis de la proteína blanco, la Ub monomérica es liberada por la acción de isopeptidasas específicas conocidas como hidrolasas C-terminal (Matsui *et al.*, 1982; Wilkinson *et al.*, 1989). Diferentes miembros de esta clase de enzimas generan monómeros de Ub a partir de sus precursores y pueden ser también importantes en la desubiquitinación de las proteínas, que han sido erróneamente marcadas o en la remoción de moléculas de Ub de los sustratos estables cuando esta modificación no es necesaria (Hershko y Ciechanover, 1998).

**Figura. 3** Esquema para mostrar la degradación de una proteína blanco por el proteosoma



(Voges *et al.*, 1999).

La proteína blanco es primero conjugada con cadenas de ubiquitina involucrándose a la enzima E1, activadora de ubiquitina, la enzima E2, transportadora, y la enzima E3 reconocedora. Después o durante la degradación por el proteosoma 26S, las cadenas de ubiquitina se liberan de la proteína blanco y estas cadenas libres de ubiquitina se desensambla por las enzimas desubiquitinisadoras UCHs y UBPS.

## V.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La presencia de espermatozoides eyaculados que se marcan con ubiquitina, detectados mediante la prueba de inmunoensayo descrita por Sutovsky *et al.*, (2001), demuestra que este mecanismo de selección espermática en el tracto reproductor del macho no es del todo eficiente o por lo menos no asegura que todos los espermatozoides eyaculados estén libres de alteraciones morfológicas o cambios en la conformación de sus proteínas. Lo anterior nos lleva a pensar lo importante que resultan los mecanismos de selección y eliminación de espermatozoides que están presentes en el tracto reproductor de la hembra, con el fin de asegurar el éxito de la fecundación.

El conocimiento de los mecanismos por los cuales se elimina a millones de espermatozoides en diferentes regiones del tracto reproductivo de las hembras es aún incierto por lo cual con este trabajo pretendemos conocer si la ubiquitinación es un proceso que participa en la selección y eliminación de espermatozoides en el tracto reproductor de la hembra.

## **VI.- HIPÓTESIS**

- 1.- La ubiquitinación es un proceso que se da en el tracto reproductor de la hembra como parte de la estrategia de selección de los gametos.

## **VII.- OBJETIVO GENERAL**

- 1.- Conocer si ocurre ubiquitinación de espermatozoides en el tracto reproductivo de la coneja

## **VIII.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1.- Detectar la presencia de espermatozoides ubiquitinados tanto en eyaculado como de los obtenidos del tracto reproductor de conejas.
- 2.- Delimitar tres regiones anatómicas vagina, útero y oviducto de la parte tubular del tracto reproductivo de la coneja y obtener los espermatozoides que se encuentren en cada una de ellas.

## **IX.- MATERIAL Y MÉTODOS.**

Se utilizaron conejos Nueva Zelanda Blancos hembras y machos, sexualmente maduros, con fertilidad probada, de entre 12 a 24 meses con un peso corporal de entre 3 y 4 Kg. Los animales permanecieron en la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL, 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 x 12 horas.

### **Obtención de muestras.**

Los eyaculados se obtuvieron de cinco conejos utilizando una vagina artificial (Ávalos *et al.*, 2004). A cada conejo se le tomaron 4 eyaculados, y se les realizó un espermograma que consistió en valorar el movimiento progresivo mediante microscopía óptica (objetivo 40 X), se estimó el porcentaje de espermatozoides vivos, mediante la técnica de tinción supravital eosina-nigrosina (Swanson, *et al.*, 1951), con esta tinción los espermatozoides muertos adquieren una coloración rojiza, mientras que los vivos no se tiñen.

La concentración espermática se calculó con una cámara de Neubauer (Freshman., 2002). Se eliminaron las muestras contaminadas con sangre, así como las que presentaron un porcentaje de viabilidad menor al 80% (Belsey *et al.*, 1980).

### **Obtención de espermatozoides del tracto reproductor de la coneja.**

A 5 conejas se les aplicó monta natural y 5 horas después se sacrificaron por dislocación cervical. Se disecó el tracto reproductor y se ligaron con hilo de algodón cada una de las tres regiones anatómicas vagina, útero y oviducto. Posteriormente se lavó la parte tubular de cada una de estas regiones haciendo correr 2 ml de una solución de buffer de fosfatos (PBS) (NaCl 8g (137mM), KCl

0.2g (2.7mM),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.44g (10mM),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.24g (2mM), pH 7.4, 800 mL de agua BD y Aforando a un L.) la suspensión de espermatozoides recuperados se incubaron a 37°C. Inmediatamente se tomo una alícuota de 4  $\mu\text{l}$  para realizar un espermograma (concentración, viabilidad, porcentaje de espermatozoides vivos mediante la tinción supravital con eosina-nigrosia, porcentaje de espermatozoides normales y movilidad progresiva).

### **Detección de ubiquitina en los espermatozoides obtenidos del tracto reproductor de la hembra.**

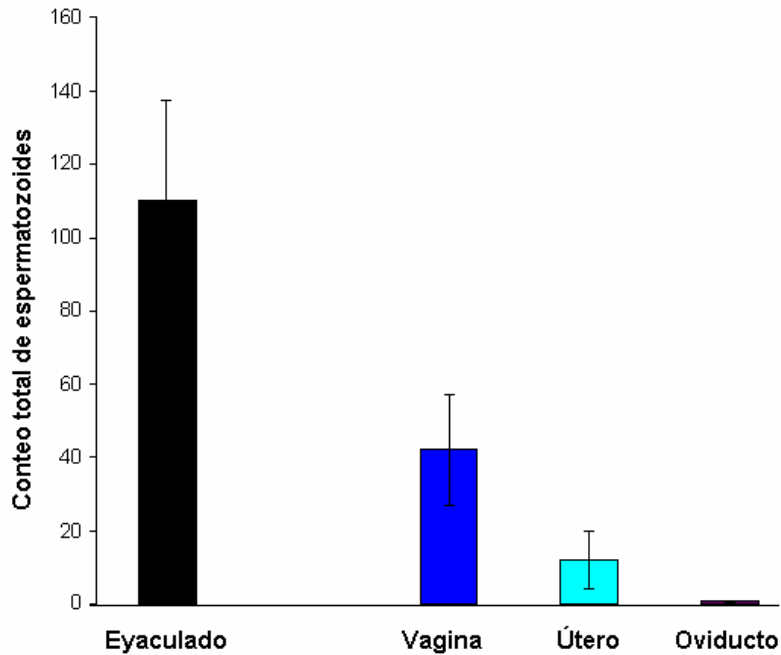
De cada una de las regiones, se analizo el porcentaje de espermatozoides unidos a ubiquitina por microscopia de fluorescencia, utilizando un anticuerpo específico para Ub marcado con isotiocinato de fluoresceína (P4D1) Santa Cruz, (Biotechnology, Inc.). Mediante la técnica de inmunoensayo de marcaje espermático con ubiquitina (SUTI) con modificaciones descrita por Sutovsky *et al.*, (1999). Los espermatozoides obtenidos de cada una de las regiones, se resuspendieron en 20  $\mu\text{l}$  de solución PBS, alícuotas de 10  $\mu\text{l}$ , fueron colocadas en porta objetos cubiertos con poly-L-lisina, los cuales fueron colocados en cajas de Petri (100x15 mm) y se incubaron por 5 minutos a 37°C, posteriormente los porta objetos fueron lavados con solución de PBS y se adicionaron 10  $\mu\text{l}$  del anticuerpo Ub (P4D1) se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se observaron en un microscopio de fluorescencia.

### **Análisis estadístico**

Los datos fueron analizados utilizando la prueba de ANOVA y con un comparativo de medias por T de Student mediante el paquete estadístico JMP 5.01<sup>a</sup> (SAS. Institute Inc.) ANOVA fue utilizada para evaluar diferencias estadísticas entre las muestras de espermatozoides ubiquitinados en las diferentes regiones del tracto reproductor de la hembra.

## X.- RESULTADOS

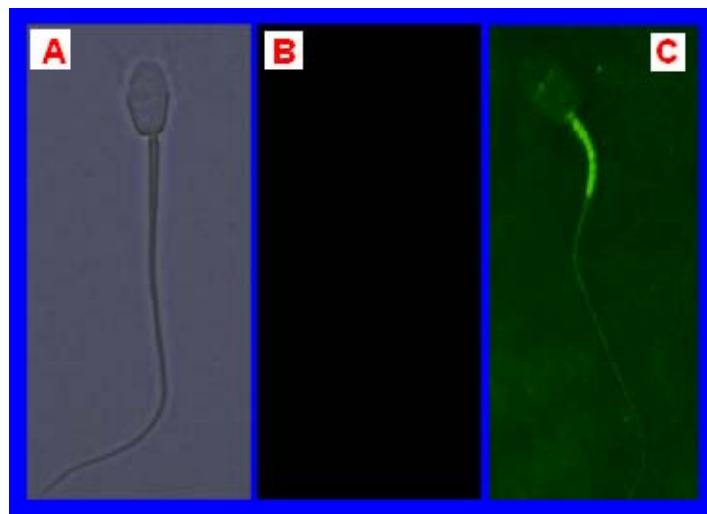
**Grafica 1. Cantidad total de espermatozoides localizados en el eyaculado así como en las diferentes regiones del tracto reproductor de la coneja.**



La cantidad total de espermatozoides localizados en el eyaculado fue de  $110 \pm 27.40 \times 10^6$ ; a las 5 horas después de haber inseminado a las conejas por monta directa se obtuvieron los espermatozoides en las diferentes regiones del tracto reproductor de la hembra en la porción de la vagina se encontró un promedio de  $42 \pm 15 \times 10^6$  espermatozoides, en el útero  $12 \pm 8 \times 10^6$ , en oviducto  $0.70 \pm 0.10 \times 10^6$ .

**Fig. 4 Fluorescencia de los espermatozoides ubiquitinados de los eyaculados, grupo control.**

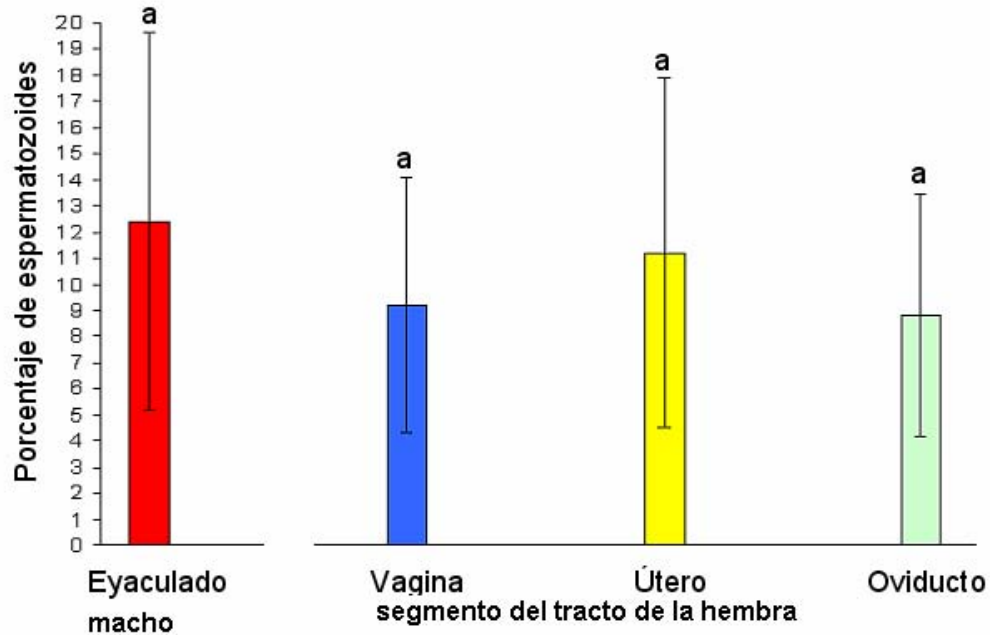
Los espermatozoides ubiquitinados detectados con anticuerpo Ub (P4D1) en eyaculado por microscopia de fluorescencia presentaron un patrón de fluorescencia ubicado en la pieza media.



Microscopia de fluorescencia donde se muestran espermatozoides en eyaculado. Encontrado en (A) (B) negativos al anticuerpo a ubiquitina (C) espermatozoide marcado con anticuerpo Ub (P4D1) mostrando un patrón de fluorescencia en su parte media del flagelo.

**Grafica 2. Porcentaje de espermatozoides ubiquitinados en el eyaculado así como en las diferentes regiones del tracto reproductor de la hembra.**

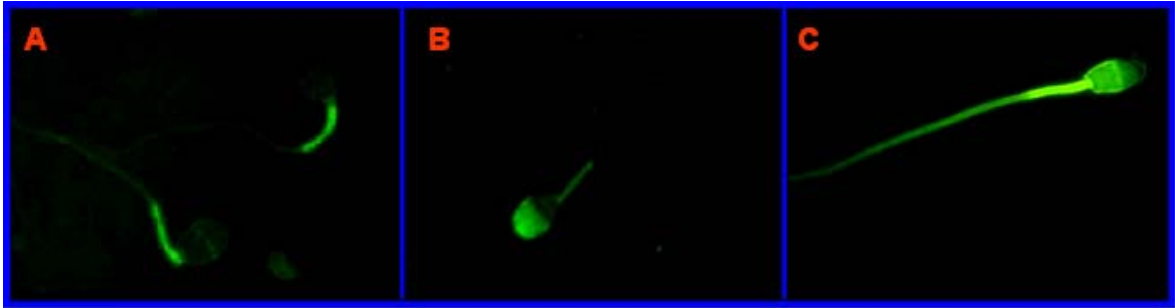
**n=5**



Esta grafica nos muestra el porcentaje de espermatozoides ubiquitinados que fue en el eyaculado de 12,4 + 7.2; mientras que en cada región del tracto reproductor de la coneja se encontró que en vagina fue de 9.3 + 4.4; en el útero de 11.1 + 6.3 y en oviducto 8.7 + 4.1, No encontrándose diferencia estadística significativa con ( $P < 0.05$ ) entre los distintos segmentos del tracto reproductivo de la coneja ANOVA



**Fig. 5. Espermatozoides ubiquitinados en el tracto reproductor de la hembra sacrificadas 5 horas después de la monta.**



Microscopia de fluorescencia mostrando espermatozoides ubiquitinados encontrados en el tracto reproductor de la hembra, (A) vagina muestra un patrón de fluorescencia de la parte media del flagelo, (B) (C) el útero y oviducto, respectivamente, se encuentra fluorescencia en la parte media así como en la parte del acrosoma en su porción anterior, identificada con el mismo anticuerpo Ub (P4D1)

El sitio de ubiquitinación en los espermatozoides obtenidos del tracto reproductor de la hembra realizada con microscopia de fluorescencia revela la presencia de dos patrones de fluorescencia. El primero en la pieza media del flagelo y el segundo en la parte anterior del acrosoma (Fig. 5).

## **XI.- DISCUSIÓN**

El transporte de los espermatozoides a través del tracto reproductor de la hembra, más específicamente durante el tránsito por el útero y oviducto, es un proceso complejo que inicia después de la inseminación natural o artificial en donde millones de espermatozoides son depositados en la vagina o útero dependiendo de la especie, con la comitiva de fertilizar uno o varios ovocitos. De estos millones de espermatozoides, solo unos cientos podrán realizar la capacitación y llegar al

istmo del oviducto aun menos lograrán sobrevivir y estar presentes a tiempo en la unión istmo-ámpula, lugar donde en la mayoría de los mamíferos se lleva acabo el proceso de fertilización (England y Burgess 2003; Suárez *et al.*, 1990). A nivel de vagina y/o útero millones de espermatozoides mueren o son eliminados por diferentes factores como el pH, la presencia de macrófagos, y anomalías mismas del espermatozoide que impiden su paso hacia el istmo. En el istmo los espermatozoides son retenidos y forman un reservorio, el cual ha sido descrito en especies como el bovino (Hunter y Wilmut, 1984), ovino (Hunter y Nichol, 1983), cerdo, hámster (Smith *et al.*, 1987), conejo, cobayo (Yanagimachi y Mahi, 1976) y ratón (Suárez *et al.*, 1990). El reservorio se encuentra en la región caudal del istmo (Suárez *et al.*, 1990). En esta estructura se almacena suficiente número de espermatozoides para la fertilización, aunque solo pocos son liberados durante la ovulación (Smith *et al.*, 1987). Se han propuesto diferentes funciones del reservorio, entre las que se encuentran limitar el riesgo de poliespermia, mantener la viabilidad del espermatozoide en el oviducto mientras se presenta la ovulación y proporcionar el microclima idóneo para facilitar el proceso de capacitación en el espermatozoide (Ellington *et al.*, 1993). De esta forma, no todos los espermatozoides depositados en la vagina alcanzarán el ámpula ni tendrán capacidad fecundante. En este estudio pudimos corroborar indirectamente el efecto de todos estos factores sobre la disminución en el número de espermatozoides, en cada una de las regiones anatómicas del tracto reproductor de la coneja, conforme los espermatozoides se dirigen al ámpula. El número de espermatozoides localizados 5 horas después de la monta nuestros resultados mostraron una mayor concentración espermática en la vagina ( $42 \pm 15 \times 10^6$ ), un poco menor en el útero ( $12 \pm 8 \times 10^6$ ) y de muy pobre en el oviducto ( $0.70 \pm 0.10 \times 10^6$ ) los cuales están dentro de lo reportado por Overstreet en 1978. Es bien sabido que el transporte de los espermatozoides dentro del tracto reproductor de la hembra inicia en el sitio de deposición del semen (vagina o útero) dependiendo de la especie, subsecuentemente los espermatozoides son distribuidos rápidamente por todo el tracto principalmente por las contracciones del miometrio

en la vagina y útero (England y Burgués, 2003) en respuesta a los componentes seminales como los estrógenos, testosterona, prostaglandinas, glucoproteínas, citocinas y factores de crecimiento (Maegaua *et al.*, 2003; Robertson, 2005). En el caso de la coneja, los espermatozoides al ser depositados en la vagina son transportados a través del cervix al útero y de ahí hasta el oviducto lugar donde ocurre la fertilización. Dichos espermatozoides se enfrentan con las defensas del tracto que incluyen: cambios en el pH alcalino del plasma seminal a un pH ácido de la vagina (Roberts, 1986; Speroff *et al.* 1994; Suarez y Pacey, 2006); así como a la respuesta inmunológica, en esta especie se ha observado la presencia de leucocitos en vagina y de neutrofilos y macrófagos en cervix y útero los cuales fagocitan un numero considerable de espermatozoides (Suárez, 2002). En 1977 Tyler encontró en la coneja una infiltración importante de neutrofilos en el cervix media hora después de la inseminación artificial. Los espermatozoides también son fagocitados por células epiteliales de la vagina y del oviducto, pero no interfiere con el proceso de fecundación (Eisenbach, 2003). Por lo que posiblemente esta fagocitosis, posterior a la inseminación, este dirigida principalmente en contra de espermatozoides dañados, sin embargo espermatozoides normales también pueden ser atacados, particularmente en la vagina porque muchos de estos espermatozoides han perdido la protección inmune que les proporciona el plasma seminal (Suarez y Oliphan, 1982; Dostal *et al.*, 1997). El moco cervical es otra gran barrera, que constituye un medio de selección para espermatozoides anormales que no lo pueden atravesar o que presentan un pobre perfil hidrodinámico así como de una vigorosa motilidad (Hanson y Overstreet, 1981; Kunz *et al.*, 1997). Por otro lado en diversas especies de mamíferos, se ha demostrado que el proceso de ovulación influye en el transporte y distribución de espermatozoides, probablemente debido a cambios en la concentración hormonal. (Hunter, 1988; Mburu *et al.*, 1996; Kaeoket *et al.*, 2002).

Los resultados que se obtuvieron en esta investigación fue que no mostraron diferencias estadísticas entre las diferentes regiones del trato reproductor de la coneja (grafica 1) después de (5 horas) posteriores a la monta.

Aunque no se conoce con precisión la participación del proceso de ubiquitinación en el espermatozoide durante su transito por el tracto reproductor femenino, se tienen algunas evidencias de su participación en diferentes procesos reproductivos (Baarends et al., 1999). Por ejemplo, la rata requiere Ubiquitina- conjugada con la enzima (E2), UBC4, para el desarrollo post natal del testículo. La diferenciación germinal en el testículo del ratón está acompañado por un aumento en la expresión de una proteína unida a una multi-Ub. La espermatogénesis de los mamíferos requiere de la remoción de las histonas unidas al DNA lo que permite el empaquetamiento dentro de la cabeza del espermatozoide, en este proceso puede estar también involucrado el sistema Ub (Agell y Mezquita, 1988; Baarends *et al.*, 1999). Adicionalmente, se ha señalado que la mitocondria del espermatozoide podría ser marcada, por ubiquitina durante la espermatogénesis para su degradación, por la maquinaria proteosomal del ovocito fecundado (Sutovsky *et al.*, 1999).

Estudios realizados por Sutovsky *et al.*, (2000; 2001b) han demostrado que los espermatozoides defectuosos de toros domésticos, ganado salvaje (búfalos y gaur), monos *reshus*, humanos y ratones presentan un índice alto de ubiquitinación en su superficie. Al parecer durante la maduración espermática en el epidídimo se presenta la ubiquitinación, ya que un abrupto incremento en el número de espermatozoides ubiquitinados ocurre durante su paso entre la rete testis a la cabeza del epidídimo en los toros (Sutovsky *et al.*, 2001b).

Nuestros datos muestran que no hay diferencia en los porcentajes de espermatozoides positivos a ubiquitina en las diferentes regiones del tracto reproductor de la coneja y espermatozoides de eyaculado, contrario al planteamiento de nuestra hipótesis, el cual refería que el porcentaje de espermatozoides positivos a ubiquitina fuera disminuyendo durante su paso por el

tracto reproductor femenino. Se ha demostrado que después de la inseminación artificial y/o monta natural en los mamíferos, los leucocitos, principalmente neutrófilos y macrófagos migran al lumen de la vagina y útero (Suárez, 2002) los cuales fagocitan un número importante de espermatozoides (Pandya y Cohen, 1985). Se han hecho estudios en los que demuestran que la fagocitosis espermática requiere de cambios estructurales a nivel de la membrana plasmática entre los que se incluyen la exposición de fosfatidilserina y la ubiquitinación. Sin embargo, suponer que el proceso de fagocitosis se presenta preferentemente en los espermatozoides con mayor porcentaje de ubiquitinación, parece no ser del todo acertado, probablemente por la distribución rápida de los espermatozoides por todo el tracto de la hembra favorecida por las contracciones realizadas por el miometrio de la vagina y útero (England y Burgess 2003) en respuesta a los componentes seminales que estimulan las contracciones musculares (Maegawa *et al.*, 2003, Robertson 2005). En el caso de la coneja se sabe que los espermatozoides al ser depositados en la vagina son transportados a través del cervix, útero hasta el oviducto, mediante dos vías, una extremadamente rápida, en la cual se habla de pocos minutos en los que los espermatozoides alcanzan el ámpula, la otra vía es más lenta lo que permite que los espermatozoides realicen la capacitación. Con base a nuestros resultados podemos suponer que estas dos vías no discriminan entre espermatozoides viables y no viables ni por el grado de ubiquitinación espermática, previos reportes indican la presencia de espermatozoides tanto muertos como anormales en las diferentes regiones del tracto a los pocos minutos de la inseminación de las conejas (Overstreet y Cooper, 1978; Kunz *et al.*, 1997).

Si bien no se encontraron diferencias entre el porcentaje de espermatozoides ubiquitinados obtenidos de eyaculado y los de las diferentes regiones del tracto reproductor femenino, en este estudio encontramos la presencia de un patrón de fluorescencia diferencial. Los espermatozoides obtenidos de los eyaculados y de la vagina presentaron en más de un 80% ubiquitinación de la pieza media del flagelo, lo cual coincide con los resultados obtenidos por Sutovsky *et al.*, 2001 y

Sutovsky *et al.*, 2002, donde muestran que espermatozoides de eyaculado presentando alguna alteración en la membrana plasmática o alguna otra anomalía, sobre todo a nivel de la pieza media del flagelo son factibles de presentar una afinidad a la ubiquitina, principalmente en la pieza media por la presencia de una proteína llamada prohibitina que se encuentra en la membrana mitocondrial y tiene afinidad por la ubiquitina, por lo que al estar dañada la membrana plasmática del espermatozoide, el anticuerpo contra ubiquitina puede llegar hasta la membrana mitocondrial y por lo tanto marcar la pieza media. En los espermatozoides obtenidos del útero y del oviducto, aparte de presentar fluorescencia en la pieza media, presentaron fluorescencia en la región acrosomal, o en casi todos sus dominios, lo cual hace suponer que cuando los espermatozoides transitan por el útero y oviducto las proteínas de los diferentes dominios sufren un cambio estructural que les permite ser detectadas por ubiquitina.

La fluorescencia diferencial de los espermatozoides ubiquitinados durante su tránsito por el tracto reproductor de la hembra, nos hace pensar que el proceso de capacitación juega un papel muy importante, ya que este proceso se caracteriza por una serie de cambios físico-químicos a nivel de la membrana plasmática, donde están involucradas proteínas de la membrana plasmática y se tienen reportes que ocurren entre los 5 y 6 horas de haberse llevado la inseminación de la coneja, lo cual coincide con el tiempo de sacrificio y obtención de los espermatozoides del tracto reproductor de la coneja en este estudio, sin embargo con los resultados de este estudio no podemos precisar si este patrón de fluorescencia diferencial fue como consecuencia del proceso de capacitación en el tracto reproductor de la hembra, por lo que es de suma importancia realizar nuevos experimentos donde se realice la capacitación espermática *in vitro*.

## **XII.- CONCLUSIONES.**

Durante el transito de los espermatozoides por el tracto reproductor de la coneja no se producen diferencia en el porcentaje de espermatozoides positivos a ubiquitina. Sin embargo si se presentaron diferencias en el patrón de fluorescencia dependiendo de la región anatómica del tracto de la hembra.

Esto nos permite concluir que sí se presenta un proceso de ubiquitinación espermática durante el transito por el útero y oviductos de la coneja y que es posible que procesos como la capacitación estén involucrados.

## **XIII.- LITERATURA CITADA**

Adeoya-Osiguwa SA., Fraser LR. 1993. A biphasic pattern of Ca<sup>2+</sup> uptake by mouse spermatozoa in vitro correlates with changing functional potential. J Reprod Fertil: 99-187.

Agell, N. y Mezquita, C. 1988. Cellular content of ubiquitin and formation of ubiquitina conjugates during chicken spermatogenesis. Biochem. J., 250, 883-889.

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

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

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

Austin, C. R. 1957. Fate of spermatozoa in the uterus of the mouse and rat. J. Endocrinol. 14, 335-342.

Ávalos-Rodríguez, A. Rocío Ortiz-Muñiz, Clara Ortega-Camarillo, Marcela Vergara-Onofre, Adolfo Rosado-García y Ana Ma. Rosales-Torres. 2004. "Fluorometric Study Of Rabbit Sperm-Head-Membrane Phospholipid Asymmetry During Capacitation And The Acrosome Reaction, Using Annexin-V Fitc". Arch Androl. Jul-Aug; 50(4):273-85.

Baarends, W. M., Roest, H. P. and Grootegoed, J. A. 1999b. The ubiquitina system in gametogenesis. *Mol. Cell Endocrinol.* 151, 5-16.

Bachmair, A., Finley, D. y Varshavsky, A. 1986. *In vivo* half life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science*, 234, 179-186.

Barros C, Vigil P, Herrera E, Arguello B and Walker R. 1984. Selection of morphologically abnormal sperm by human cervical mucus. Arch Androl 12 (Suppl.), 95–107.

Bebington, C Bell, Sc, Doherty. 1999a. Localisation of ubiquitina and ubiquitina cross-reactive protein in human and baboon endometrium and deciduas during the menstrual cycle and early pregnancy. *Biology of Reproduction* 60, 920-928.

Bebington, C., Doherty, FJ., y Ndukwe, G. 2000b. The progesterone receptor and ubiquitina are differentially regulated within the endometrial glands of the natural and stimulated cycle. *Mol. Hum. Reprod.* 6, 264-268

Belsey, M. A., K. S. Moghissi., R. J. Aliason., C. A. Paulsen., A. Gallegos. y M.R.N Prasad. 1980. Laboratory manual for the examination of human semen, cervical mucus interaction published by Press Concerní Singapore.

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

Brouwers JFHM, Gadella BM, Van Golden LMG., Andielen AGM. 1998. Quantitive analysis of phosphatidylcolinamolecular species using HPLC and light scattering detection. *J Lipid Res* 39: 344-359. 7-11.

Chau, V., Tobias, J.W., Bachmair, A. 1989. A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science*, 234, 1576-1583.



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

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

Claus R. 1990. Physiological role of seminal components in the reproductive tract of the female pig. *J Reprod Fertil Suppl* 40,117–131.

Ciechanover, A., Elias, S., Heller, H. 1982. Covalent affinity purification of ubiquitin-activating enzyme, *J. Biol. Chem.*, 257. 2537-2542.

Ciechanover, A. Orian, A. y Schwartz, A.L. 2000. The ubiquitin- mediated proteolytic pathway: mode of action and clinical implications. *J. Cell. Biochem.*, 77 (Suppl. 34), 40-51.

Crane LH and Martin L. 1991. Postcopulatory myometrial activity in the rat as seen by video-laparoscopy. *Reprod Fertil Dev* 3,685–698.

D’Cruz OJ, Wang B-L and Haas GG Jr. 1992. Phagocytosis of immunoglobulin G and C3-bound human sperm by human polymorphonuclear leukocytes is not associated with the release of oxidative radicals. *Biol Reprod* 46,721–732.

DeMott RP, Lefebvre R and Suarez SS. 1995. Carbohydrates mediate the adherence of hamster sperm to oviductal epithelium. *Biol Reprod* 52, 1395–1403.

de Vries KJ., Wiedmer T., Sims PJ., Gadella BM. 2003. Caspase-independent exposure of aminophospholipids and tyrosine phosphorylation in bicarbonate responsive human sperm cells. *Biol Reprod* 68:2122–2134.

de Ziegler D, Bulletti C, Fanchin R, Epiney M and Brioschi 2001. Contractility of the nonpregnant uterus: the follicular phase. *Ann N Y Acad Sci* 943, 172-184

Dostal J, Veselsky L, Marounek M, Zelezna B and Jonakova V. 1997. Inhibition of bacterial and boar epididymal sperm immunogenicity by boar seminal immunosuppressive component in mice. *J Reprod Fertil* 111, 135-141

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

England G.C.W. and Burgess C. 2003. Survival of dog spermatozoa within the reproductive tract of the bitch. *Reproduction in Domestic Animals* 38 325–326.

Eisenbach M. 2003. Why are sperm cells phagocytosed by leukocytes in the female genital tract. Elsevier Science Ltd, 60, 4, 590-592

Ellington JE., Ball BA., Blae BJ, Wilker CE. 1993. Capacitation like membrane changer and prolonged viability in vitro of equine spermatozoa cultured with uterine tube epithelial cells. *Am J Vet Res* 54:1505-1510.

Evans RW, Weaver DE; Clegg ED. 1980. Diacyl, alkenyl and alkylether phospholipids in ejaculated, in utero-, and *in vitro* incubated porcine spermatozoa. *J Lipid Res*; 21:223-228.

Fraile, B, R Martin, MP De Miguel, MI Arenas, FR Bethencourt, F Peinado, R Paniagua, y L. Santamaria. 1996. Light and electron microscopic immunohistochemical localization of protein gene product 9.5 and ubiquitin immunoreactivities in the human epididymis and vas deferens: *Biol Reprod.*, 55 291–297.

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

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

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

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

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

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

Gadella BM and Harrison RAP. 2002. 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*; 67: 340–350.

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

Ganoth D. Leshinsky E. Eytan E. 1988. A multicomponent system that degrades proteins conjugated to ubiquitina. *J. Biol. Chem.* 263, 12412-12419

Haas, A.L. and Rose, I.A. 1982. The mechanism of ubiquitin activating enzyme. *J. Biol. Chem.*, 257, 10329-10337.

Haas, A.L. and Bright, P.M. 1988. The resolution and characterisation of putative ubiquitin-carrier protein isozymes from rabbit reticulocytes. *J. Biol. Chem.*, 263, 13258-13267.

Hanson FW and Overstreet JW. 1981. The interaction of human spermatozoa with cervical mucus in vivo. *Am J Obstet Gynecol* 140,173–178.

Harkeman W, Harrison RAP, Miller NGA, Topper, EK and Woelders H. 1998. Enhanced binding of zona pellucida proteins to the acrosomal region of intact boar spermatozoa in response to fertilizing conditions: a flow cytometric study. *Biol reprod*; 58: 421-430.

Hermo, L, J Dworkin, y R. Oko. 1988. Role of epithelial clear cells of the rat epididymis in the disposal of the contents of cytoplasmic droplets detached from spermatozoa: *Am J Anat.* 183 107–124.

Hershko, A., Heller, H., Elias. S. 1983. Components of ubiquitin-protein ligase system. *J. Biol. Chem.*, 258, 8206-8214.

Hershko, A., Heller, H., Eytan. E. 1984. Role of the  $\alpha$ -amino group of protein in ubiquitin-mediated protein breakdown. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 7021-7085.

Hershko, A. y Ciechanover, A. 1998. The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.*, 67, 425-479.

Hough R. Pratt G. and Rechsteiner M. 1987. purification of two high molecular weight proteases from rabbit reticulocyte lysate *J. Biol. Chen*, 262, 8303-8313

Hunter HF y Nichol R. (1983). Transpor of spermatozoa in the sheep oviduct preovulatory sequestering of cells in the caudal istmus. *J. Exp Zoo*, 228 121-128.

Hunter RHF., y Wilmot I. 1984. Sperm transport in the cow: periovulatory redistribution of viable cells within the oviduct. *Reprod. Nutr Dev* 24: 597-608.

Hunter R.H.F. 1988. Low incidence of fertilisation in superovulated cows: a physiological explanation. *Veterinary Record* 123 443.

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

Jentsch, S. Seufer, W. Sommer, T. 1990. Ubiquitin conjugating enzymes: novel regulators of eukaryotic cells. *Trends Biochem. Sci.*, 15, 195-198.

Jentsch, S., Seufer, W., and Hauser, H. P. 1991. Genetic analysis of the ubiquitin system. *Biochim Biophys. Acta*, 1089, 127-139.

Kaeoket K, Persson E & Dalin AM. 2002. The influence of pre- and post-ovulatory insemination on sperm distribution in the uterine tube, accessory sperm to the

zona pellucida, fertilisation rate and embryo development in sows. *Animal Reproduction Science* 71 239–248.

Koegl M, Hoppe T, Schlenker S, Ulrich HD, Mayer TU, Jentsch S. 1999. A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell*, 96:635-644

Kunz G, Beil D, Deiniger H, Einspanier A, Mall G, Leyendecker G. 1997. The uterine peristaltic pump. Normal and impeded sperm transport within the female genital tract. *Adv Exp Med Biol.*;424:267-77

Langlais J, Zollinger M, Plante L, Chapdelaine A, Bleau G and Roberts KD. 1981. Localization of cholesteryl sulfate in human spermatozoa in support of a hypothesis for the mechanism of capacitation. *Proc Natl Acad Sci USA*; 72: 66-70.

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

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

Lyons EA, Taylor PJ, Zheng XH, Ballard G, Levi CS and Kredentser JV. 1991. Characterization of subendometrial myometrial contractions throughout the menstrual cycle in normal fertile women. *Fertil Steril* 55,771–774.

Maegawa M, Kamada M, et al .2002. Arepertoire of cytokines in human seminal plasma. *J Reprod Immunol* 54:33-42

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

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.

Matsui S. I. Sandberg A.A. Negoro S. 1982. Isopeptidase: a novel eukariotyc enzyme that cleaves isopeptidase bonds. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 79, 1535-1539.

Mburu JN, Einarsson S, Lundeheim N & Rodriquez-Martinez H. 1996. Distribution, number and membrane integrity of spermatozoa in the pig uterine tube in relation to spontaneous ovulation. *Animal Reproduction Science* 45 109–121.

Menge AC and Edwards RP. 1993. Mucosal immunity of the reproductive tract and infertility. In Zaz RK (ed.), *Immunology of Reproduction*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 19–36.

Olivera M. Ruiz T. Tarazona A. Giraldo C. 2006. El espermatozoide desde la eyaculación hasta la fertilización. *Rev Col Cienc Pec* Vol. 19:4

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

Overstreet JW and Cooper GW. 1978. Sperm transport in the reproductive tract of the female rabbit. I. The rapid transit phase of transport. *Biol Reprod* 19,101–114.

Pandya IJ., Cohen, J. 1985. The leukocytic reaction of the human uterine cervix to spermatozoa. *Fertility Sterility*; 41: 417-421

Parks JE and Hammerstedt RH. 1985. Developmental changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. *Biol. Reprod.* 32: 653-668.

Phillips DM and Mahler S. 1977a. Phagocytosis of spermatozoa by the rabbit vagina. *Anat Rec* 189,61–72.

Phillips DM and Mahler S. 1977b. Leukocyte emigration and migration in the vagina following mating in the rabbit. *Anat Rec* 189,45–60.

Pickart, C.M. y Rose, A. 1985. Ubiquitin C-terminal hydrolase acts on ubiquitin C-terminal amides. *J. Biol. Chem.*, 260, 7903-7910.

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

Reeve L, Ledger WL and Pacey AA. 2003. Does the Arg-Gly-Asp (RGD) adhesion sequence play a role in mediating sperm interaction with the human endosalpinx? Hum Reprod 18,1461–1468.

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

Roberts SJ. 1986. Veterinary Obstretic and Genital Diseases. 3<sup>rd</sup> edn. Stephen Roberts, Woodstock, VT.

Robertson Sarah A. 2005. Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract. Cell Tissue Res . 322: 43–52

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

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

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

Santamaria, L, R Martin, R Paniagua, B Fraile, M Nistal, G Terenghi, y JM. Polak. 1993. Protein gene product 9.5 and ubiquitin immunoreactivities in rat epididymis epithelium: Histochemistry., 100 131–138.

Schlesinger, D.H., Goldstein, G. y Niall, H.D. 1975. The complete amino acid sequence of ubiquitin, an adenylate cyclase stimulating polypeptide probably universal in living cells. Biochemistry, 14, 2214-2218.

Speroff L, Glass RH & Kase NG. 1994. Clinical and gynecologic endocrinology and infertility. Williams and Wilkins, Baltimore, p 231-250.

Smith TT., Koyangi, Yanagimachi 1987. Distribución and number of spermatozoa in the oviduct of the golden hamster after mating and artificial insemination. *Biol Reprod* 37: 225-234.

Suarez SS, Drost M, Redfern K and Gottlieb W. 1990. Sperm motility in the oviduct. In Bavister BD, Cummins J and Roldan ERS (eds), *Fertilization in Mammals*. Serono Symposia, Norwell, MA, pp.111-124.

Suárez, SS. 2002. Gamete transport. In: DM. Hardy (ed). *Fertilization*. San Diego: Academic Press, 3-28.

Suarez SS and Oliphant G. 1982. The interaction of rabbit spermatozoa and serum complement proteins. *Biol Reprod* 27, 473-483.

Suarez SS and Pacey AA. 2006. Sperm transport in the female reproductive tract. *Human Reprod Update*, Vol.12, No.1 pp. 23-37.

Sung, P., Prakash, S. y Prakash, L. 1990. Mutation of cysteine-88 in the *Saccharomyces cerevisiae* RAD6 protein abolishes its ubiquitin conjugating activity and its various biological functions. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 87, 2695-2699.

Sutovsky P, Moreno DR, Ramalho-Santos J, Dominko T, Simerly C. y Schatten G. 1999. Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature* 402:, 371-372.

Sutovsky P, Moreno DR, Ramalho-Santos J, Dominko T, Simerly C. y Schatten G. 2000. Ubiquitinated Sperm Mitochondria, Selective Proteolysis, and the Regulation of Mitochondrial Inheritance in Mammalian Embryos. *Biol. Reprod.* 63: 582-590.

Sutovsky P, Terrada Y. y Schatten G. 2001a. Ubiquitin-based sperm assay for the diagnosis of male factor infertility. *Human Reprod* 16: 250-258

Sutovsky P., Moreno R., Ramalho-Santos J. Dominko T. Thompson WE, Schatten G. 2001b. A putative ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis. *H. Cells.Sci.* 114:1665-1675.

Sutovsky P, Neuber E and Schatten G. 2002 Ubiquitin-dependent, sperm quality control mechanism recognizes spermatozoa with DNA defects, as revealed by dual ubiquitin-TUNEL assay. *Mol Reprod Dev* 61,406–413.



Sutovsky P, Hauser R y Sutovsky M. 2004. Increased levels of sperm ubiquitina correlated with semen quality in men from an andrology laboratory clinic population. *Human Reprod* 19: 628-638.

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

Topfer-Petersen E, Romero A, Varela PF, Ekhlasi-Hundrieser M, Dostalova Z, Sanz L, Calvete JJ. 1998. Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia.* Aug-Sep;30(4-5):217-24. Review.

Tyler KR. 1977. Histological changes in the cervix of the rabbit after coitus. *J Reprod Fertil* 49,341–345.

Varshavsky, A. 1991. Naming a targeting signal. *Cell*, 64, 13-15.

Vega H. A. Treviño L. C. and Félix R. 2002. canales iónicos y su papel funcional en el espermatozoide avance y perspectiva, 21 89-95

Vijay-Kumar, S., Bugg, C.E. and Cook, W.J. 1987. Structure of ubiquitin refined at 1.8<sup>Å</sup> resolution. *J. Mol. Biol.*, 194, 531-544.

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

Voges D. Zwickl P. Baumeister W. 1999. The 26S proteasome: a molecular machina designed for controlled proteolysis. *Ann Rev Biochem.* 68: 1015-1068.

Wilcox AJ, Weinberg CR and Baird DD 1995. Timing of sexual intercourse in relation to ovulation. Effects on the probability of conception, survival of the pregnancy, and sex of the baby. *Engl J Med* 333, 1517-1521.

Wilkinson K.D., Lee K. Deshpande S. 1989. The neuron-specific protein PGP 9.5 is a ubiquitin C-terminal hidrolase. *Science*, 246, 670-673

Wrobel K-H, Kujat R and Fehle G. 1993. The bovine tubouterine junction: general organization and surface morphology. *Cell Tissue Res* 271,227–239.

Yanagimachi R and Chang MC. 1963. Sperm ascent through the oviduct of the hamster and rabbit in relation to the time of ovulation. *J Reprod Fertil* 6,413–420.

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

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