



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

“ESTUDIO DE LA UBIQUITINACIÓN DE PROTEÍNAS DE LA
MEMBRANA PLASMÁTICA DEL ESPERMATOZOIDE DE CONEJO
DURANTE LA CAPACITACIÓN Y REACCIÓN ACROSOMAL”.

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

Torres Ortiz Minerva Carolina

Tutor:

Dr. Ávalos Rodríguez Alejandro

Comité Tutorial:

Dra. Trujillo Ortega Maria Elena

Dr. Zarco Quintero Luis Alberto

México D.F.

2009



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.



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.

La Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (F.M.V.Z. - U.N.A.M) pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE BIOQUÍMICA
DE LA REPRODUCCIÓN DEL DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA
Y ANIMAL DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO.**

**La autora fue becaria del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
(CONACYT), con número de registro 205323.**

JURADO DEL EXÁMEN

El jurado asignado por el Comité Académico del Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México aprobó la tesis que presentó:

Minerva Carolina Torres Ortiz

Honorable Jurado de Exámen:

Presidente:

Dr. Javier de Jesús Valencia Méndez

Secretario:

Dr. Alejandro Ávalos Rodríguez

Vocal:

Dra. Marcela Vergara Onofre

Suplente:

Dr. Alfredo Medrano Hernández

Suplente:

Dr. Joel Hernández Cerón

ASESORES DE TESIS

Dr. Alejandro Ávalos Rodríguez

Profesor Titular "C" en la UAM-X
Miembro del SNI
Investigador del Departamento de Producción Agrícola y Animal
Bioquímica de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana- Xochimilco. México D.F.

Dra. Ma. Elena Trujillo Ortega

Profesor titular "C" en la FMVZ UNAM
Jefa de la Unidad de Planeación Territorial de la Facultad de
Medicina Veterinaria y Zootecnia
Universidad Nacional Autónoma de México.
Miembro del SIN.

Dr. Luis Zarco Quintero

Profesor titular "C" de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Universidad Nacional Autónoma de México.
Miembro del SNI Nivel III.

DEDICATORIAS

A mis padres.

A mis hermanos.

A mis sobrinas.

A mi abuelo.

AGRADECIMIENTOS

A mi Tutor principal: Dr. Alejandro Ávalos Rodríguez, por la dirección de esta tesis, sobre todo por su apoyo, confianza y amistad.

Al Comité Tutorial: Dra. María Elena Trujillo y al Dr. Luis Zarco Quintero por su colaboración en este proyecto.

A mis compañeros y amigos: Gloria González, Ximena Munguía, Karla Rojo, Olga Rubio, Ricardo Macías, Ulises Rodríguez, Omar Rojo, Elías Velázquez, Gilberto Flores, Arnulfo Montero, Cristian Urias, Daniel Ramírez, Ángel Toledano, Yoná Solis...

A todos los que directa e indirectamente trabajaron conmigo para terminar esta tesis.

Al Bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana por la donación del material biológico.

Al Honorable Jurado de Examen.

Empieza por hacer lo necesario, luego lo posible...
y de pronto estarás haciendo lo imposible...

INDICE GENERAL

I.- INDICE	1
II.- INDICE DE CUADROS, FIGURAS Y CUADROS	2
III.- RESUMEN	3
IV.- SUMMARY	4
V.- INTRODUCCIÓN	5
VI.- ANTECEDENTES	7
1.- Anatomía del aparato reproductor del macho	7
2.- Morfología del espermatozoide maduro	7
3.- Estructura de la membrana plasmática del espermatozoide	9
4.- Asimetría de la membrana plasmática	12
5.- Cambios en la membrana plasmática	14
6.- Superficie del espermatozoide	16
7.- Composición lipídica y flujo de membrana	17
8.- Proteínas de la membrana plasmática	19
9.- Maduración epididimaria	21
10.- Proceso de capacitación	23
11.- Proceso de reacción acrosomal	27
12.- Proceso de ubiquitinación	34
13.- Ubiquitina	34
a) Conjugación	36
b) Proteólisis	38
c) Apoptosis	41
14.- Ubiquitinación en la espermatogénesis	42
15.- Ubiquitinación como marcador de calidad espermática	43
VII.- JUSTIFICACIÓN	46
VIII.- OBJETIVOS	48
IX.- HIPÓTESIS	48
X.- MATERIAL Y MÉTODOS	49
A) OBTENCIÓN DE MUESTRAS	49
B) PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	50
C) DETECCIÓN DE UBIQUITINA	51
D) ESTUDIO CITOMÉTRICO	52
E) ANÁLISIS ESTADÍSTICO	52
XI.- RESULTADOS	53
XII.- DISCUSIONES	63
XIII.- CONCLUSIONES	72
XIV.- LITERATURA CITADA	73

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y CUADROS

Figura 1. Principales componentes y dominios del espermatozoide maduro	11
Figura 2. Asimetría fosfolípídica de la membrana plasmática	15
Figura 3. Proceso de ubiquitinación	40
Figura 4. Tinción de espermatozoides de conejo con clorhidrato de tetraciclina	54
Figura 5. Tinción de espermatozoides de conejo con azul brillante de Coomassie	55
Figura 6. Fotografía de microscopia de fluorescencia mostrando un espermatozoide de conejo con dos colas ubiquitinado en la parte media del acrosoma en la porción anterior y también en la parte media del flagelo	57
Figura 7. Fotografía de microscopia de fluorescencia mostrando al centro dos espermatozoides de conejo ubiquitinados principalmente en la parte media del flagelo	57
Figura 8. Fotografía de microscopia de fluorescencia mostrando espermatozoides de conejo ubiquitinados	58
Figura 9. Fotografía de microscopia de fluorescencia mostrando espermatozoides de conejo ubiquitinados	58
Figura 10. Resultados obtenidos en el citómetro de flujo en muestras de eyaculado	61
Figura 11. Resultados obtenidos en el citómetro de flujo en muestras de epidídimo	62
Cuadro 1. Resultados obtenidos: volumen (ml), motilidad (%), viabilidad (%), y concentración de espermatozoides/ml en muestras de eyaculado y de epidídimo	53
Cuadro 2. Porcentajes de espermatozoides capacitados de muestras de eyaculado y de epidídimo de las 0 a las 6 horas	54
Cuadro 3. Porcentajes de espermatozoides con reacción acrosomal de muestras de eyaculado y de epidídimo de los 0 minutos a los 60 minutos post capacitación	56
Cuadro 4. Porcentajes de espermatozoides de muestras de eyaculado y de epidídimo que presentaron ubiquitinación de las 0 a las 6 horas de capacitación y a las 7 horas durante la reacción acrosomal	59
Cuadro 5. Relación de tiempo con respecto al color para la comparación de resultados obtenidos en el citómetro de flujo	61
Gráfica 1. Porcentaje de espermatozoides capacitados	55
Gráfica 2. Porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal	56
Gráfica 3. Porcentaje de espermatozoides ubiquitinados de ambas muestras	59
Gráfica 4. Porcentaje de espermatozoides ubiquitinados de eyaculado	60
Gráfica 5. Porcentaje de espermatozoides ubiquitinados de epidídimo	60

“ESTUDIO DE LA UBIQUITINACIÓN DE PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA DEL ESPERMATOZOIDE DURANTE LA CAPACITACIÓN Y REACCIÓN ACROSOMAL”.

M. en C. Minerva Carolina Torres Ortiz.

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue conocer si ocurre ubiquitinación en la membrana plasmática de espermatozoides de conejo durante la capacitación y reacción acrosomal *in vitro*. Se utilizaron conejos Nueva Zelanda con fertilidad probada. Se obtuvieron muestras de eyaculado mediante el método de vagina artificial, y de cola de epidídimo mediante sacrificio, disección y perfusión. Se indujo capacitación con medio Brackett y reacción acrosomal con Progesterona. Se utilizó el método de clorotetraciclina para monitorear la capacitación, y el método de azul de Coomasie para la reacción acrosomal. Se cuantificaron los espermatozoides con proteínas ubiquitinadas mediante la técnica de inmunoensayo (SUTI) utilizando el anticuerpo Ubiquitina, mediante microscopio de fluorescencia. Los resultados de volumen, viabilidad, concentración y motilidad estuvieron dentro del rango normal. No existió diferencia significativa entre espermatozoides que presentaron capacitación de las muestras de eyaculado y epidídimo a las 0 horas, sin embargo en tiempos posteriores (2, 4 y 6 horas) si se observó diferencia significativa entre ambos ($p < 0.05$). No hubo diferencia significativa entre los espermatozoides que presentaron reacción acrosomal en muestras de eyaculado y epidídimo a los 0 y 30 minutos, sin embargo a los 60 minutos si se observó diferencia significativa entre ambos ($p < 0.05$). Ubiquitinación de $14 \pm 3.7\%$ en eyaculado y $24 \pm 3.3\%$ en epidídimo a las 0 horas; $12 \pm 3.8\%$ en eyaculado y $22 \pm 2.8\%$ en epidídimo a las 3 horas; $10 \pm 3.5\%$ en eyaculado y $19 \pm 4.1\%$ en epidídimo a las 6 horas; y $7 \pm 2.1\%$ en eyaculado y $16 \pm 3.2\%$ en epidídimo a las 7 horas. Se concluye que sí ocurre ubiquitinación en proteínas de la membrana de espermatozoides de conejo durante la capacitación y reacción acrosomal, además que existe una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre ambos tipos de muestras en todos los tiempos, siendo un porcentaje más alto de espermatozoides ubiquitinados en el epidídimo.

Palabras clave: espermatozoide, capacitación, reacción acrosomal, ubiquitinación.

SUMMARY

The purpose of this study was to know if ubiquitination process occurs in the spermatozoon's plasmatic membrane of rabbits during the capacitation and acrosomal reaction process *in vitro*. New Zealand's rabbits with proven fertility were used in this process. Samples of ejaculation were taken with artificial vagina and from epididymis duct, through sacrifice, dissection and perfusion. Capacitation was inducted by Brackett's way and acrosomal reaction with progesterone. The chlortetracycline's method was used to monitor capacitation, and Blue Coomasie's method was used to monitor acrosomal reaction. The spermatozoa with ubiquitin proteins were quantified through the technique of immune essay (SUTI) using the antibody ubiquitin by means of fluorescence microscope. Results of volume, viability, concentration and motility were into normal range. There were not significant difference between spermatozoa that had capacitation in the sample obtained from ejaculation and the sample obtained from epididymis at hour 0, however in subsequent times (hours 2, 4, 6), it were showed significant differences between spermatozoa ($p < 0.05$). There were not significant differences between spermatozoa that showed acrosomal reaction in samples obtained from ejaculation and samples obtained from epididymis at minutes 0 and 30, however at minute 60, there were significant differences between spermatozoa ($p < 0.05$). Ubiquitination of $14 \pm 3.7\%$ in ejaculation samples and $24 \pm 3.3\%$ in epididymis samples, at hour 0; $12 \pm 3.8\%$ in ejaculation samples, $22 \pm 2.8\%$ in epididymis samples, at hour 3; $10 \pm 3.5\%$ in ejaculation samples and $19 \pm 4.1\%$ in epididymis samples at hour 6 and finally $7 \pm 2.1\%$ in ejaculation samples and $16 \pm 3.2\%$ in epididymis samples at hour 7. The conclusion is that ubiquitination process occurs in proteins of the spermatozoon's membrane in rabbits during capacitation and acrosomal reaction, we can also conclude that exists a significant difference ($p < 0.05$) between the type of samples, in all the periods in which the samples were obtained, being the highest percentage of spermatozoa ubiquitinated on the epididymis.

Key words: sperm, capacitation, acrosomal reaction, ubiquitination.

INTRODUCCIÓN

La fecundación en los mamíferos, ocurre como consecuencia del encuentro de los gametos masculino y femenino (Johanson et al., 2009), que son resultado de una fina selección que garantiza que tanto la estructura como la funcionalidad sean adecuadas. Este proceso ocurre en varios niveles, incluyendo la selección de los espermatozoides capacitados sobre el vitelo del ovocito durante la fecundación, así como una pre-selección tanto del espermatozoide como del ovocito antes de su liberación desde las gónadas. Los ovocitos experimentan una dramática reducción en su número, durante el cual sólo algunos ovocitos de la dotación total de cada especie crecen hasta alcanzar su madurez y ser ovulados, mientras que la mayoría se pierde por el proceso de atresia (Rosales, 2008).

En cuanto al espermatozoide, algunos autores han propuesto un mecanismo de eliminación, en el cual se ve involucrada la apoptosis. Los componentes de la vía apoptótica se encuentran en el linaje celular espermatogénico y en el espermatozoide maduro (Yin et al., 1998). Sin embargo, aún no se tiene claro un mecanismo definitivo para el control de la selección del espermatozoide (Sutovsky et al., 2001a).

Algunos métodos subjetivos para el diagnóstico y predicción de las infertilidades en el macho (Ozanon, 2005), están actualmente disponibles, muchos de ellos se fundamentan en la detección de daños en el DNA por pruebas que se basan en la integridad de cromatina en los espermatozoides (van der Schans et al., 2000), otros ensayos detectan los componentes de la vía apoptótica ligados a anomalías espermáticas (Zhongguo et al., 2008).

Los espermatozoides defectuosos, así como contaminantes de origen celular presentes en el eyaculado, pueden ser detectados mediante la unión de las proteínas dañadas de su membrana plasmática con un marcador proteolítico universal llamado ubiquitina (Ciechanover, 1994), aparentemente este marcaje ocurre cuando el espermatozoide atraviesa el epidídimo (esto ha sido confirmado en ungulados, roedores y primates) Las colas de espermatozoides anormales, contaminantes de origen celular, espermátides alargadas y redondas, leucocitos y restos celulares comienzan a ubiquitinarse en la

superficie y estos son reconocidos experimentalmente con el uso de anticuerpos para ubiquitina (Sutovsky et al., 2000).

Algunas proteínas de la superficie del espermatozoide cuando pierden su estructura, son detectadas por la ubiquitina, de allí que se ha pensado que este proceso puede ser un indicador de alteraciones de la membrana plasmática que tengan que ver con la capacidad fertilizante de los espermatozoides, sin embargo no existen experimentos que comprueben esta aseveración. Si nos detenemos a analizar lo que sucede durante los procesos de capacitación y reacción acrosomal, en donde ocurre una serie de cambios fisicoquímicos a nivel de la membrana plasmática del espermatozoide, entre ellos la remoción de proteínas de superficie se podría pensar que las proteínas marcadas con ubiquitina podrían ser las primeras seleccionadas para la remoción, viéndolo de esta manera el proceso de ubiquitinación en el espermatozoide podría ser un biomarcador de la calidad del semen (Ávalos, 2004).

ANTECEDENTES

1.- Anatomía del aparato reproductor del macho

El aparato reproductor en los machos de todos los mamíferos consiste en un testículo izquierdo y uno derecho, cada uno consta de un epidídimo, un conducto deferente y una vesícula seminal los cuales llegan a la uretra pélvica y al pene. El sistema secretor incluye una asociación de la uretra, próstata y las glándulas. La uretra sirve como un canal urogenital, donde convergen tanto la orina como el semen. Dentro del testículo, en el parénquima se localizan los túbulos seminíferos individuales conectados directamente a una red de túbulos, conocida como la *rete testis*, la cual se encuentra en el mediastino. De la *rete testis* emergen varios conductos eferentes los cuales atraviesan la túnica albugínea y convergen dentro de la cabeza del epidídimo, donde se forma un solo conducto epididimal (Donnelly, 2004).

El epidídimo es un tubo empaquetado en un saco de tejido conectivo que es una extensión de la túnica albugínea. Anatómicamente el epidídimo consta de tres partes bien definidas: cabeza, cuerpo y cola. La cabeza es la parte más grande, recorre el polo dorsal del testículo y desciende en forma de asa en la superficie dorso lateral del testículo. El cuerpo del epidídimo se extiende hacia el polo distal del testículo y se une íntimamente a la cara caudo-media del testículo. La cola del epidídimo tiene forma cónica y se une estrechamente por su base mayor al polo distal del testículo. Las circonvoluciones del epidídimo van disminuyendo en amplitud progresivamente desde la cabeza al cuerpo, en el cual se aprecia una construcción delgada de la túnica albugínea; pero a nivel de la cola aumenta el diámetro del tubo y el tamaño de las circonvoluciones (Mostafa et al, 2008).

2.- Morfología del espermatozoide maduro

La célula germinal masculina se produce en la gónada mediante un proceso permanente de división de las células germinales o espermatogonias.

Durante la espermiogénesis ocurren una serie de eventos en el epitelio de los túbulos seminíferos controlado hormonalmente por el eje hipotálamo hipófisis-gónada, que culmina con la formación de espermatozoides maduros a partir de células precursoras, las espermatogonias. Durante la espermiogénesis los organelos de los espermatozoides son modificados morfológica y funcionalmente con la finalidad de tener las características apropiadas de una célula somática capaz de fertilizar al ovocito (Morel, 1999).

En el espermatozoide pueden identificarse 5 regiones estructurales: cabeza, cuello, pieza media, principal y final del flagelo todas delimitadas por la membrana plasmática (Donnelly, 2004).

La membrana plasmática está compuesta principalmente por fosfolípidos, colesterol, y proteínas. Los lípidos se encuentran distribuidos en una bicapa, con una región hidrofílica o polar expuesta y una región hidrofóbica localizada al interior de esta bicapa. Las proteínas se encuentran distribuidas entre los lípidos de manera integral o bien en forma periférica; algunas sirven de canales o bien como receptores. Algunas proteínas en la superficie exterior se encuentran unidas a cadenas de carbohidratos. Es sabido que la proporción de colesterol-fosfolípidos, la naturaleza de los fosfolípidos y la temperatura determinan la fluidez de la membrana, por lo que a temperatura corporal se encuentra en un estado fluido (Juárez et al., 2000).

La cabeza del espermatozoide incluye al núcleo delimitado por la membrana nuclear, donde se encuentra la cromatina altamente condensada y la teca perinuclear; esta última principal elemento citoesquelético de la cabeza (Juárez, 2000). En la región apical, se encuentra el acrosoma que es una vesícula altamente especializada que contiene enzimas necesarias para la penetración de la zona pelúcida del ovocito.

La cabeza para su estudio, se ha dividido en tres dominios de membrana: el de la región apical o subacrosomal, el de la región ecuatorial y el de la región posacrosomal.

Pieza de conexión o cuello: Se extiende desde la cabeza en la base del núcleo hasta la pieza media del flagelo. En la pieza de conexión se observan la placa basal, cuerpos laminares, el capitulum, las columnas segmentadas, el cuerpo basal y el axonema.

Pieza media: Se extiende desde la región distal de la pieza de conexión hasta el anillo de Jensen (annulus). En la pieza media se distinguen el axonema, la vaina mitocondrial y las fibras densas.

Axonema: ocupa el eje central de todo el flagelo (pieza media, principal y final) y está constituido por dos microtúbulos sencillos, rodeado por nueve dobletes de microtúbulos y sus proteínas asociadas. La vaina mitocondrial que rodea al axonema se caracteriza por la presencia de una gran cantidad de mitocondrias distribuidas sobre su circunferencia, éstas contienen enzimas y cofactores necesarios para la producción de ATP, que a su vez es necesario para la actividad contráctil del flagelo. Las fibras densas son estructuras citoesqueléticas dispuestas entre la vaina mitocondrial y cada uno de los microtúbulos periféricos del axonema (Alberts et al., 2002).

Pieza principal: es el segmento más largo del flagelo. Se extiende desde el anillo de Jensen hasta el extremo proximal de la pieza terminal, distinguiéndose las siguientes estructuras: vaina fibrosa, fibras densas, anillo de Jensen y axonema.

Pieza terminal: es el segmento final y el más corto del flagelo del espermatozoide está formado por el axonema envuelto directamente por la membrana plasmática.

La célula espermática madura carece de un grupo importante de organelos: retículo endoplásmico, complejo de Golgi, lisosomas y peroxisomas para la síntesis y degradación de componentes celulares (Frits et al., 2000). También es oportuno mencionar que en el espermatozoide maduro la superficie de la membrana no está en comunicación con las estructuras membranosas intercelulares porque el transporte membranal mediado por vesículas está bloqueado.

3.- Estructura de la 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 (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:

- 1.- 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.
- 2.- Segmento principal (segmento acrosomal) dominio localizado por encima de la mayor porción del acrosoma.
- 3.- Dominio ecuatorial (acrosomal posterior) ubicado en los límites entre la parte posterior del acrosoma y la llamada región posacrosomal. (Ver Figura 1)

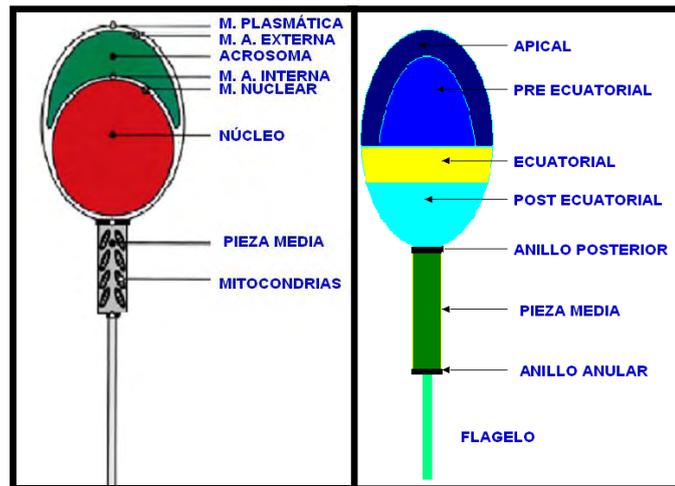
El dominio marginal y del segmento principal, a menudo son referidos como acrosoma anterior o como capa anterior. Estos dos dominios están separados por una media luna central en el caso de espermatozoides de cobayo y posiblemente de otras especies (Frits et al., 2000).

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. Estudios realizados con criofactura 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, constituye un componente de la mayor importancia en el dominio acrosomal de la membrana plasmática del espermatozoide humano (Frits et al., 2000).

La relación entre fosfolípidos y proteínas 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 proteínas y lípidos sea diferente en varios dominios de la membrana plasmática del espermatozoide (Yanagimachi, 1994; Frits et al., 2000).

La composición y organización de los lípidos en la membrana plasmática del espermatozoide le confieren propiedades características (Frits et al., 2000). Aunque hay variación considerable entre las diferentes especies de mamíferos, la membrana plasmática contiene en promedio 70% fosfolípidos, 25 % lípidos neutros y 5 % de glicolípidos (en base molar) (Frits et al., 2000).

Figura 1. Principales componentes y dominios del espermatozoide maduro.



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 son: la región apical, la preecuatorial, ecuatorial, postecuatorial, anillo posterior, pieza media, anillo anular y flagelo (Frits et al., 2000).

Los fosfolípidos pueden ser divididos en dos grupos: fosfoglicerolípidos y esfingomielinas. Los fosfoglicerolípidos 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 (Barroso et al, 2002).

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 esfingomielina, 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. Durante la capacitación la cantidad de fosfatidilcolina pueden aumentar debido a la metilación de la fosfatidiletanolamina (Frits et al., 2000; Barroso et al., 2002; Orozco et al., 2008).

Existen variaciones entre espermatozoides de diferentes especies, en cuanto a la concentración de lípidos neutros que componen su membrana plasmática, 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 (Frits et al., 2000, Espinoza et al., 2009).

4.- Asimetría de la membrana plasmática

Las moléculas lipídicas que presentan la asimetría más marcada y constante, en cuanto a su distribución en la membrana plasmática de las células animales, son los glicolípidos, los cuales se caracterizan por estar únicamente en la mitad exterior de la bicapa, quedando sus carbohidratos al descubierto en la superficie de la célula (Frits et al., 2000, Orozco et al, 2008).

En cuanto a los componentes fosfolipídicos de la membrana plasmática de los espermatozoides, se encuentran asimétricamente distribuidos, de manera semejante a como acontece en la membrana plasmática de las células somáticas. Diversos métodos han revelado que los fosfolípidos como esfingomielina (SM) y en menor grado fosfatidilcolina (PC), se encuentran principalmente en la cara externa de la membrana (Gadella et al., 1999). Los aminofosfolípidos como fosfatidiletanolamina (PE) y especialmente la fosfatidilserina (PS) están localizados en la capa lipídica interna. Si bien es cierto que en general la fosfatidilserina no se encuentra en grandes proporciones en la membrana plasmática, es importante resaltar que por el hecho de que casi el 100% de este fosfolípido se encuentre en la cara interna de la membrana, la presencia de este en la cara externa es considerada como indicador de la pérdida de la

asimetría membranal (Barroso et al., 2002). La Anexina V es una proteína que en presencia de concentraciones adecuadas de Ca^{2+} tiene una alta especificidad por la fosfatidilserina, por lo cual ha sido usada como una técnica de elección para detectar pérdida de la asimetría de la membrana (Rosales et al, 2008; Espinoza et al., 2009). La citometría de flujo es una técnica que en la actualidad es utilizada, como una prueba estándar confiable, para observar los cambios en la asimetría de las células espermáticas (Gadella et al., 1999).

La formación y mantenimiento de la asimetría de las membranas biológicas es importante para sus funciones y por lo tanto para el mantenimiento de la célula. Los componentes estructurales de las bicapas se encuentran en equilibrio. Estudios reportados en eritrocitos han podido demostrar que los aminofosfolípidos son transportados desde la cara externa hasta la cara interna de la membrana por la aminofosfolípido translocasa, y que este movimiento es responsable de la distribución asimétrica de los fosfolípidos en los eritrocitos, así como en la membrana de otras células eucariontes. Cuando en la lámina externa de la bicapa aparece la fosfatidilserina, ésta es rápidamente devuelta hacia la lámina interior por la translocasa de amino fosfolípidos (Espinoza et al., 2009). La aminofosfolípido translocasa puede ser bloqueada por vanadato o por algún sistema que inhiba la producción de ATP.

Dentro de los movimientos más importantes de los fosfolípidos tenemos el movimiento de la cara externa hacia la cara interna de la membrana se denomina “flip” y el movimiento de los fosfolípidos de la cara interna hacia la externa se denomina “flop” (Kuypers, 2008). Bajo la mayoría de las condiciones el mecanismo de “flip-flop” es lento y su tiempo medio se mide en intervalos de horas o semanas. Sin embargo se ha encontrado que el movimiento de proteínas del exterior al interior de la membrana cataliza el paso de algunos fosfolípidos de una lámina a la otra por mecanismos de “flip-flop”, tanto dependientes de ATP como independientes de él, en un tiempo menor a 5 minutos.

Otras enzimas, semejantes a las translocasas, han sido descritas recientemente como importantes en la regulación de la distribución asimétrica de los fosfolípidos de las membranas. Estas enzimas, llamadas “flipasas” regulan una rápida translocación de fosfolípidos por el movimiento de “flip-flop”. La actividad de “flip-flop” de fosfolípidos

puede ser incrementada significativamente por la incorporación de antibióticos formadores de canales iónicos, como la anfotericina B.

Los iones de calcio juegan un importante papel en algunos procesos fisiológicos por su habilidad para regular la estructura y función de las membranas celulares y por sus acciones en algunas vías metabólicas, particularmente aquellas involucradas en los procesos de contractibilidad y metabolismo energético (Masson et al., 2002).

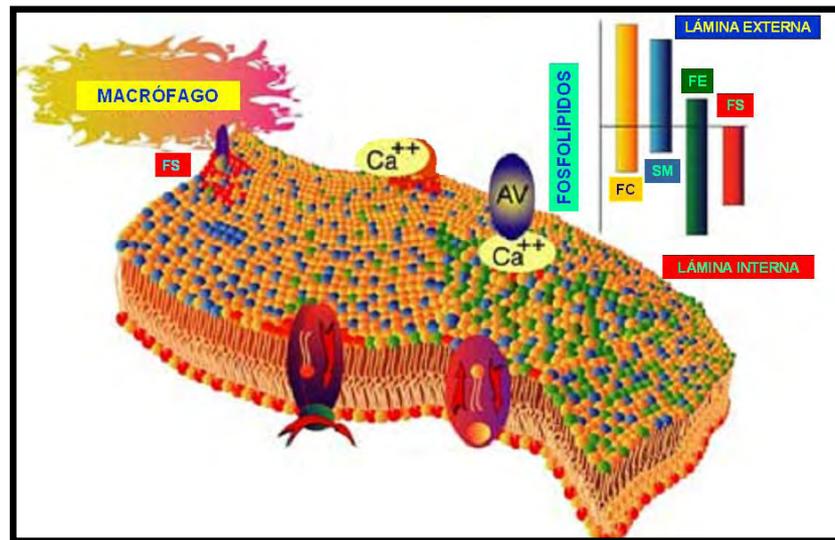
Es conocido que el incremento de la concentración del Ca^{2+} citosólico, inducido por el ionóforo A-23187, o por incorporación de Ca^{2+} al medio, estimula la producción de una distribución al azar de los lípidos de la membrana. El desorden que se produce en la membrana ocasiona pérdida de la asimetría de los fosfolípidos de la membrana y posteriormente la formación de vesículas. La relación entre vesiculación y translocación de fosfolípidos fue demostrado por la observación de experimentos que mostraron espontáneos brotes y vesiculaciones en liposomas después de que se les indujo redistribución transmembranal de fosfolípido. Desde hace mucho tiempo se conoce que ciertos ionóforos como el A23187 son capaces de unir y transportar cationes divalentes como el Ca^{2+} a través de barreras lipídicas, incluyendo las membranas celulares, posteriormente se demostró que este ionóforo era capaz de incrementar el contenido de cAMP en células de la médula ósea. En virtud de la conocida relación del metabolismo del calcio con el cAMP, algunos autores decidieron utilizar a este ionóforo como inductor de la capacitación espermática. Actualmente se sabe que el uso de A-23187, induce la reacción acrosomal (RA) por un mecanismo regulatorio intracelular que produce un rápido y masivo influjo de Ca^{2+} al interior del espermatozoide (Picherit et al., 2004).

5.- Cambios en la membrana plasmática

La estructura básica y celular de la membrana consiste en una bicapa lipídica en la cual se fijan las proteínas. Algunas de estas proteínas tienen una función estructural. Otras son receptores, enzimas y moléculas transportadoras que se involucran en el mantenimiento de la homeostasis y transmite las señales extracelulares a través de la membrana. No se conocen con certeza los dominios de la membrana, algunos muestran diferentes mecanismos: 1) elementos del citoesqueleto en el interior de la

superficie de la membrana plasmática y ancla a otras proteínas de la membrana; 2) las proteínas de membrana son asociadas y agregadas; 3) la asociación con lípidos de una forma geométrica con propiedades termodinámicas.

Figura 2. Asimetría fosfolipídica de la membrana plasmática.



La membrana plasmática de la mayoría de las células presenta una distribución asimétrica en cuanto a su distribución fosfolipídica, tal es el caso de fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina que de forma normal se encuentran principalmente en la lámina interna de la bicapa. (Ávalos et al, 2004).

Tanto Weinman y Williams (1964) postularon la eliminación o alteración en el material que constituye a la superficie del espermatozoide como parte importante en la capacitación. Si recordamos el modelo aceptado del flujo del mosaico de las membranas, las proteínas o las glicoproteínas no son unidas covalentemente con las bicapas lipídicas a la matriz de la membrana. Las proteínas intrínsecas embonadas en las bicapas pueden ser removidas por tratamientos; estas proteínas periféricas son asociadas con las interacciones electrostáticas de la membrana. Algunos otros cambios son el resultado de la alteración química y/o física de las bicapas lipídicas durante la capacitación.

Se ha reportado o sugerido cambios en la composición de los fosfolípidos de la membrana del espermatozoide durante la capacitación como ocurre en los espermatozoides de hámster. Se ha puesto atención en el colesterol de la membrana del espermatozoide, ya que ocasiona una variedad de efectos profundos en las

características biológicas de la membrana (por ejemplo, la permeabilidad iónica activa y pasiva) por la orientación reguladora y en el flujo de la membrana lipídica. Se ha propuesto una eliminación gradual del colesterol por medio de la albúmina u otros componentes del fluido del aparato reproductor de la hembra, ácidos grasos y lisofosfolípidos (Marin-Briggiler et al., 1999).

6.- Superficie del espermatozoide

Las propiedades físicas del espermatozoide son importantes para la función *in vitro*, si estas se alteran pueden originar la reducción en la habilidad del espermatozoide para: 1) la migración a través del complejo bipolímico del epitelio de la superficie del aparato reproductor de la hembra; 2) interacciones apropiadas con las células epiteliales y/o la inmunocompetencia de células del aparato reproductor femenino y 3) penetración del ovocito. Una prueba funcional de las características de la superficie de los espermatozoides humanos es la penetración del moco cervical.

En la superficie del espermatozoide se eliminan proteínas y carbohidratos, además se presenta una modificación y redistribución de estos mismos; también sufre una disminución en las cargas negativas de la superficie que fueron adquiridas en su maduración epididimal. Los cambios en los carbohidratos van a involucrar a glicoproteínas, disminución en las cargas negativas como un reflejo de los grupos de azúcares terminales (Dacheux, 2003). La capacitación puede ser reversible por la decapitación, particularmente por la incubación con proteínas del plasma seminal y lípidos, a estos se les llama factores decapitantes. Dichos factores son incorporados dentro de la superficie de la membrana, además de otros elementos antagonistas a la capacitación espermática. La remoción y adsorción de proteínas de la superficie espermática es generalmente reconocida como un prerrequisito para la capacitación. La unión de ciertas proteínas a la superficie se ha asociado con la maduración epididimal o a la eyaculación, y ocurre durante la capacitación. *In vitro* estas sustancias pueden prevenir la capacitación premadura y la hiperactivación en la movilidad y/o que la reacción acrosomal ocurra sin estar en contacto con el ovocito. Existen datos de que en la capacitación *in vitro* con los lavados sólo remueven una parte de estas proteínas, por lo que sólo se logra una disminución. *In vitro* al eliminar el fluido seminal después del coito el espermatozoide inicia una migración rápida.

Durante la incubación en el aparato reproductor de la hembra y al estar en contacto con estos fluidos, el espermatozoide pierde estas proteínas.

El rol del plasma seminal en la capacitación es importante, el tiempo en el que se realiza la capacitación es diferente entre el espermatozoide del epidídimo y del eyaculado en especies menores, los cambios fisiológicos en el espermatozoide son mediados en el plasma seminal. El espermatozoide adquiere un aumento en las cargas negativas durante su maduración epididimaria, este incremento se debe al residuo de ácido siálico y a grupos sulfatos. La reducción de las cargas positivas en la superficie durante la capacitación, se cree que se debe a la pérdida, modificación, eliminación de sialoglicoproteínas, sulfatoglicoproteínas y sulfatolípidos en la superficie de la membrana. La reducción de cargas negativas en la superficie involucra un aumento en la permeabilidad de la membrana hacia el calcio y promueve la fusión de la membrana (Manjunath et al., 2002; Dacheux, 2003).

7.- Composición lipídica y flujo de membrana

La composición de la membrana plasmática del espermatozoide probablemente es un factor importante en el proceso de capacitación y la reacción acrosomal. En la membrana del espermatozoide, la proporción tiene significado junto con la cadena de los ácidos grasos, de los fosfolípidos. Los lípidos tienen la característica de promover el flujo de la membrana, la permeabilidad y la fusión.

Durante la capacitación la membrana plasmática experimenta muchos cambios físicos; es claro que en esta área se inicia la fusión de la membrana. La composición de los lípidos sufre dos cambios importantes durante la capacitación, se cree que estos preparan a la membrana espermática para la reacción acrosomal: un decremento en la proporción del colesterol a fosfolípidos (C/P) en la membrana plasmática y un aumento en los lípidos fusogénicos. Al disminuir el colesterol puede actuar para sensibilizar a la membrana haciéndola menos permeable, con menos flujo y susceptible a la fusión. En suma, estos efectos directos sobre la bicapa lipídica, alteración en las propiedades físicas de la membrana pueden influir en la movilidad, conformación y activación de las enzimas de la membrana y el transporte molecular. El espermatozoide humano tiene particularmente elevados niveles de colesterol, aproximadamente un 50% (fracción

molar) de la membrana lipídica. La colesteryl-sulfatasa es secretada por el epidídimo y es incorporada a la membrana plasmática durante la maduración epididimal, también se presenta en el plasma seminal (Cross, 1998; Dacheux, 2003).

El aceptor de moléculas toma de la superficie celular el colesterol, promoviendo en un futuro la salida del colesterol de la membrana plasmática. Un sistema de proteínas aceptoras que involucra el transporte del colesterol a la sangre y la regulación de los niveles de colesterol libre de la superficie celular. La mejor proteína transportadora del colesterol a la sangre es la lipoproteína de alta densidad (HDL). La eliminación del colesterol de la membrana plasmática en otras células involucra a la HDL junto con la LCAT y la lipoproteína A. La esterificación de las cadenas acil del colesterol por la LCAT son eliminadas. Las secreciones del aparato reproductor de la hembra contienen moléculas aceptoras, capaces de promover la salida del colesterol del espermatozoide. Bajo la influencia de estrógenos, la cantidad y/o actividad del aceptor de colesterol promueve un aumento en el suero, en fluidos del aparato reproductor y del fluido folicular. *In vitro* la albúmina puede actuar como aceptor de colesterol, su actividad es mucho más baja que la HDL *in vitro* (Therein, 1998).

Las cargas negativas de la superficie del colesterol estabilizan la interacción con la bicapa lipídica e inhibe la eliminación del colesterol por las proteínas aceptoras. La estabilización de la membrana por el colesterol y la colesteryl-sulfato son aquí muy bien degradadas por la insaturación y los ácidos grasos al lado de las cadenas de la membrana fosfolipídica. Los inhibidores de la metilación de los fosfolípidos evitan la reacción acrosomal en los espermatozoides de Hamster. La arilsulfatasa A, es una enzima asociada con la maduración del espermatozoide y el plasma seminal, es capaz de la disulfuración de los seminolípidos, la cual disminuye durante la capacitación del espermatozoide del ratón (Dacheux, 2003).

La capacitación requiere de estímulos inespecíficos que ocurren en el desarrollo, incluyendo muchos de los sitios del aparato de la hembra. La presencia de cadenas acil altamente insaturadas, aumenta el contenido de colesterol, este mecanismo produce lípidos fusogénicos preprogramados de la membrana plasmática para lograr las características que se requieren en la reacción acrosomal. Las alteraciones en la composición de los lípidos es debido a un incremento en la permeabilidad de la

membrana que puede afectar la capacidad del espermatozoide en el control del calcio y/o pH. Las proteínas transportadoras de la membrana tienen componentes hidrofóbicos que están en contacto con la bicapa lipídica; la composición lipídica puede ser influenciada por la permeabilidad de la membrana y las proteínas de esta. De manera similar la actividad de otras proteínas de membrana puede afectarse, incluyendo a los receptores y a los elementos de la señal de transducción. Estas alteraciones pueden ser detectadas directamente por el uso de métodos bioquímicos, incluyendo a la alteración de colesterol y fosfolípidos detectados en el espermatozoide.

Los ácidos grasos insaturados de la membrana celular particularmente son susceptibles al ataque de las moléculas de especies reactivas de oxígeno. La peroxidación de los lípidos es el resultado del aumento en la permeabilidad de la membrana, disminución en la homeostasis y otros eventos. Un incremento de la peroxidación de los lípidos puede ser el resultado de cualquiera de esos tres factores: 1) aumento en la producción de oxígeno reactivo de las especies; 2) disminución en la actividad de sistemas protectores y/o 3) un aumento en la susceptibilidad de los lípidos (Engel et al., 1999; Selvaraju et al., 2008).

8.- Proteínas de la membrana plasmática

Las proteínas de la membrana son importantes en la capacitación espermática y en la reacción acrosomal, incluyendo a los receptores moleculares, moléculas de la señal de transducción y transporte de las moléculas. La activación de estas proteínas se altera por el desarrollo anormal de los lípidos. La función normal de las moléculas transportadoras de la membrana es esencial para la función normal del espermatozoide. En particular, el calcio y el pH son involucrados en la capacitación y en la reacción acrosomal. El aumento del calcio y de protones en la capacitación tiene como resultado un decremento en la longevidad y reacción acrosomal prematura (García, 2000).

La concentración anormal de calcio, pH y/o AMPc pueden inhibir la fertilización por alteración de la capacitación y la reacción acrosomal, ocasionando defectos intracelulares lo que causa sensibilidad en la movilidad espermática, ya que el axonema es susceptible a los pequeños cambios en la concentración intracelular por

estos factores (Zabludovsky et al., 1999; Kasimanickam et al., 2007; Branham et al., 2006).

Durante el paso de los espermatozoides a través de la cabeza, cuerpo y cola del epidídimo, estos adquieren su maduración (forma definitiva, movilidad y capacidad de para penetrar al ovocito), uno de los eventos de amplia importancia que ocurre durante este proceso es que la membrana plasmática del espermatozoide cambia en cuanto a composición proteica debido a que en la cabeza del epidídimo se secretan concentraciones importantes de proteínas que se unen a la membrana plasmática. De manera similar ocurre cuando el espermatozoide es eyaculado y entra en contacto con el plasma seminal rico en proteínas que también se unen a la membrana plasmática (Dacheux, 2003; Karpenko et al., 2007).

Dentro de las principales modificaciones que se llevan a cabo en la membrana plasmática de los espermatozoides en la maduración epididimaria se encuentran los cambios en la distribución de partículas intramembranales, adsorción de antígenos, glicoproteínas y ácido siálico, alteraciones en la composición de lípidos, disminución de número de grupos SH expuestos, aumento de la carga neta de la superficie, disminución de la fluidez de la membrana y la presencia de factores descapacitantes (García, 2000; Dacheux, 2003).

En espermatozoides de mamíferos incluyendo al humano, se presentan una serie de cambios antes de que ellos adquieran su capacidad para fertilizar, estos cambios se conocen como capacitación y reacción acrosomal. La capacitación se presenta después de la eyaculación y ocurre fisiológicamente en el aparato reproductor de la hembra y puede ser definida como una serie de cambios bioquímicos en la membrana plasmática que preparan al espermatozoide para la reacción acrosomal. Dentro de los principales cambios fisicoquímicos que ocurren durante la capacitación se encuentran, una remoción o alteración gradual de glicoproteínas periféricas, una redistribución de glicoproteínas integrales, la reducción de colesterol de la membrana y cambios en la distribución y composición de fosfolípidos (Yanagimachi, 1994; Cánovas y Coy, 2008). Una vez finalizado el proceso de capacitación, la reacción acrosomal puede ser inducida cuando el espermatozoide entra en contacto con la zona pelúcida, o en condiciones *in vitro* usando el estímulo apropiado.

9.- Maduración epididimaria

Muchas de las características de la membrana plasmática del espermatozoide, que determinan su capacidad fisiológica basal para realizar la fertilización del gameto femenino, ocurren durante el transcurso del espermatozoide a través del conducto epididimario. Tales cambios forman parte del proceso que se conoce como maduración epididimaria del espermatozoide. En la mayoría de las especies de mamíferos el espermatozoide ha adquirido su capacidad de movilidad progresiva y su capacidad fertilizante al llegar al segmento de unión entre la parte media y la parte caudal del epidídimo (Marín et al., 2008).

En este periodo el espermatozoide permanece en el epidídimo, donde se llevan a cabo los cambios metabólicos y estructurales, que ocurren principalmente en la cola del epidídimo (es un proceso andrógeno dependiente), en esta región las células epiteliales muestran un transporte activo con la luz del órgano dependiente posiblemente del sistema trifosfato de adenosina, así como de la presencia de grupos sulfhidrilos libres, dicho transporte es inhibido por p-cloromercuribenzoato (molécula muy activa con los grupos sulfhidrilos). La presencia de este transporte activo permite la acumulación de ciertas sustancias que se encuentran en el epidídimo y las cuales son muy importantes para el proceso de maduración y son la carnitina y la acetil-carnitina.

Después de la eyaculación el espermatozoide sufre modificaciones en la superficie de su membrana por la adsorción de diversas moléculas de estructura glicoproteica (factores decapacitantes), los cuales pueden inhibir las actividades enzimáticas de tipo glicohidrolítico y trípico, que son consideradas indispensables para realizar la fertilización. La inhibición enzimática protege al aparato acrosomal del espermatozoide hasta que alcanza las vías genitales femeninas en donde se recuperan las propias enzimas que son necesarias para fertilización (Dacheux, 2003; Marín, et al., 2008).

Los cambios detectados en este proceso son los siguientes:

- Migración de la gota citoplasmática hacia la porción final de la pieza media y su posterior desprendimiento.
- Angostamiento consecutivo del cuello.
- Disminución de la constricción del anillo.

- Deshidratación progresiva y aumento de la microviscosidad.
- Reducción en el contenido de fosfolípidos y colesterol no esterificado.
- Aumento de la densidad de grupos aniónicos en la membrana plasmática.
- Estabilización de la cromatina nuclear, aumento de los puentes disulfuro (S-S).
- Alcance de cierta firmeza del flagelo.

Estos dos últimos pasos son considerados como necesarios para la penetración de las envolturas que recubren al óvulo y para proteger el material genético durante esa penetración (Zarate, 1996).

El factor decapacitante aislado del fluido epididímario tiene la propiedad de estabilizar y proteger al semen hasta que sufra la capacitación y la reacción acrosomal en el aparato de la hembra. Una de las acciones conocidas es la inhibición de las enzimas hialuronidasa y corona-penetrante, lo mismo sucede con la proteinasa "acrosin". El transporte, depósito y selección de gametos masculinos tarda aproximadamente entre 11 y 16 días en recorrer el epidídimo y la cauda del epidídimo es su lugar de depósito. En este sitio se concentran debido a la enorme absorción del líquido testicular; se ha calculado la relación espermatozoide/plasma epididímario y es de 1:1 en la cabeza; en la región de la cola es de 70:1.

10.- Proceso de capacitación

Los cambios fisiológicos confieren al espermatozoide la habilidad para la fertilización. Se ha observado que la capacitación que ocurre *in vitro* es de forma espontánea con un medio definido y con la adición de fluidos biológicos, esto sugiere que el proceso es modulado intrínsecamente por el espermatozoide mismo, de esta manera las células son pre-programadas para que experimenten la capacitación si se incuban en un medio apropiado. Si bien los medios de capacitación no son universales difieren para cada especie, sin embargo estos tienen componentes como la albúmina, el calcio y los iones bicarbonato que juegan un papel importante en la promoción de la capacitación.

Antes de que un espermatozoide maduro y móvil pueda penetrar la corona radiada y la zona pelúcida que rodea al óvulo, debe experimentar el proceso de activación de la capacitación, que dura alrededor de 6 horas en el conejo (Moore, 1985). Bioquímicamente la capacitación espermática se caracteriza por el aumento en la permeabilidad de la membrana plasmática, disminución en el contenido de fosfolípidos y cambios en su carga neta. El modelo más aceptado de los procesos que acompañan a la capacitación implica la eliminación de la superficie de los factores decapacitantes, con lo que se logra la desestabilización de la membrana plasmática y un cambio que va a favorecer la interacción con la membrana acrosomal externa (Díaz, 1994). Virtualmente no se conocen las condiciones o factores que controlan directamente la capacitación del espermatozoide en el aparato genital de la hembra. Se han sugerido una variedad de sustancias posibles para la capacitación espermática o factores controladores de la capacitación en el aparato. Estas incluyen a enzimas como la glucoronidasa, proteasas, neuroaminidasas, arisulfatasa, fucosidasa, acetil hexosaminadosa, anhidrasa carbónica, esteroides sulfato, glicosaminoglicanos, catecolaminas, taurina e hipotaurina. La capacitación y la fertilización *in vitro* son ciertamente posibles debido a las condiciones anatómico-fisiológicas del aparato genital de la hembra (Tannert et al., 2007).

La capacitación espermática consiste en el desarrollo funcional que sufre el espermatozoide, cuando ocurren una serie de cambios o modificaciones estructurales y funcionales como resultado de su interacción con las secreciones de la mucosa del aparato reproductor de la hembra. Este proceso es necesario y provee al

espermatozoide de las condiciones adecuadas para que se efectúe la fertilización. En estas modificaciones se incluyen cambios bioquímicos y fisiológicos en donde se alteran y eliminan sustancias que fueron integradas en la membrana plasmática del espermatozoide cuando pasaron por el epidídimo (Pellicer, 1995; Tannert et al., 2007).

La capacitación se lleva a cabo en diferentes porciones del aparato reproductivo de la hembra, la fase inicial se lleva a cabo en el cuerpo del útero y la segunda fase probablemente de mayor importancia en los cuernos uterinos (Ávalos et al, 2004). La primera fase de la capacitación es un cambio preparatorio en el espermatozoide manifestado por cambios en la estructura de la membrana y en la segunda fase los cambios drásticos en la motilidad son los que le permiten penetrar al óvulo.

En los cuernos uterinos aumenta el fluido folicular, esto provoca una elevación en las cantidades de calcio, lo que propicia las modificaciones en la membrana plasmática del espermatozoide las necesarias para que posteriormente se lleve a cabo la reacción acrosomal. (Ávalos et al, 2004)

Dentro de las modificaciones estructurales que se producen en la membrana plasmática del espermatozoide durante la capacitación se incluyen la supresión de algunos componentes superficiales que se adhieren al espermatozoide al entrar en contacto con el plasma seminal, factores decapacitantes, disminución de la carga neta superficial, y de algunos compuestos sulfatados, cambios en la distribución de carbohidratos superficiales, cambios en el patrón de organización de las partículas intramembranales provocados por modificaciones en la fluidez de la membrana plasmática y cambios en la estructuración de las proteínas membranales de la cabeza del espermatozoide. Todos estos cambios se reflejan en cambios fisiológicos de los cuales el considerado como el más importante e indispensable para que se realice la capacitación es un cambio en la permeabilidad de la membrana a los iones de calcio, a los cuales parece ser normalmente impermeable (Ávalos et al, 2004).

Una vez que el gameto masculino es atraído hacia el útero y es capacitado se produce el reconocimiento específico en el aparato genital de la hembra, entre el espermatozoide, maduro y capacitado, y el óvulo maduro, a través de proteínas

presentes en la zona pelúcida, o *cumulus oophorus*, y las presentes en la membrana externa de la cabeza del espermatozoide.

Puede considerarse que la capacitación termina cuando las modificaciones estructurales de las membranas acrosomales permiten iniciar los mecanismos de fusión membranar que constituyen la reacción acrosomal.

La capacitación espermática ocurre de forma natural en los espermatozoides maduros que involucra a una secuencia de eventos complejos y una serie de cambios que sufren los espermatozoides tanto en su estructura como en su composición y en sus funciones. Sin embargo como se mencionó anteriormente este proceso también puede presentarse de forma prematura cuando los espermatozoides están dañados o existe un factor que inicie el proceso antes de tiempo.

La capacitación es un proceso que normalmente experimenta el espermatozoide en su trayecto a través del aparato genital de la hembra, pero que puede provocarse *in vitro* utilizando agentes inductores, estos pueden ser el AMP cíclico y el fluido folicular; entre otros (Branham et al., 2006).

La capacitación normal ocurre en el aparato genital debido a los estrógenos de las hembras. El sitio de la capacitación completa va a depender del sitio de depósito de los espermatozoides después del coito o la inseminación artificial. La capacitación empieza después de un tiempo pasando por el cérvix y el moco cervical.

En 1963, Yanagimachi y Chang fueron los primeros en reportar que el espermatozoide maduro puede ser capacitado *in vitro*. Aunque el éxito de la fertilización *in vitro* depende de una adecuada capacitación del espermatozoide, mucho de esto depende del medio por sí mismo, del *cumulus oophorus* o de la trompa uterina. En etapas tempranas de la investigación, se utilizó el fluido folicular o suero sanguíneo como medios, todos tienen composición variada y complicada. La reacción acrosomal es el indicador de la capacitación completa. La ausencia de esta no necesariamente significa una falla del espermatozoide durante la capacitación.

Dentro de los cambios que ocurren en la membrana plasmática se encuentran la desestabilización, la remoción de agentes decapacitantes, la activación de sitios receptores, etc. La reacción acrosomal consiste en la unión de la membrana externa del acrosoma con formación de vesículas y liberación de enzimas acrosomales (Mortimer y Swan, 1999; Tannert et al., 2007).

La composición de los fosfolípidos y su relación con el colesterol regulan la fluidez y permeabilidad iónica de las membranas biológicas y ambos cambian durante la capacitación (Cross, 1998). En el caso de los espermatozoides humanos existen evidencias de que la capacitación *in vitro* involucra la eliminación de colesterol de la membrana plasmática y que la pérdida de lípidos membranales durante este evento parece ser un fenómeno reversible asociado con la presencia de proteínasceptoras de esteroides en el medio de incubación (Yanagimachi, 1994).

Cuando se incuban espermatozoides con un medio capacitante químicamente definido y después se estudia la concentración de lípidos (colesterol y fosfolípidos) en las células completas y fraccionadas, se observa que el colesterol y la relación colesterol-fosfolípidos disminuye en un 20-30% en la fracción de la cabeza. La adición de líquido folicular o suero sanguíneo a este medio, sin embargo produce la eliminación del 40-50% del colesterol membranal, el cual es atrapado por las lipoproteínas y albúmina presente en estas secreciones (Cross, 1998).

Las alteraciones físicas y/o químicas de la bicapa de lípidos membranales durante la capacitación parecen tener como resultado adicional la inducción de redistribución en las proteínas intrínsecas (Tannert et al., 2007).

Tras la capacitación y antes de comenzar la reacción acrosomal, los espermatozoides adquieren un movimiento muy vigoroso, conocido como movilidad tipo látigo, caracterizado por un gran aumento en la frecuencia y en la amplitud de movimientos del flagelo, lo que le proporciona un gran empuje para la penetración a través de la zona pelúcida. La importancia funcional de la hiperactivación puede incluir la regulación del transporte espermático en el oviducto y la generación de la fuerza requerida para la penetración de la capa de células de la granulosa y de la zona pelúcida en el ovocito (Kinukawa et al., 2003).

La movilidad espermática es considerada como uno de los parámetros importantes en el proceso de fertilización, ya que participa tanto en el transporte de los espermatozoides hacia la región ampular del oviducto, así como durante la interacción de los gametos y los eventos previos a la fusión de los mismos. El primer cambio en el patrón de movilidad que se observa *in vitro* después de la eyaculación, coincide con la eliminación del plasma seminal (Kinukawa et al., 2003).

11.- Proceso de reacción acrosomal

El acrosoma es una membrana que cubre la porción anterior de la cabeza del espermatozoide, similar a un gorro que cubre; se encuentra en la mayoría de las especies. Topográficamente se localiza por dentro de la membrana plasmática, con la cual contacta, la membrana acrosomal externa; internamente, se encuentra la membrana acrosomal interna. El acrosoma o membrana circundante tiene dispuestas una gran cantidad de enzimas hidrolíticas que incluyen-hialuronidasa, acrosín, pro-acrosín, fosfatasa, aril-sulfatasa, colagenasa, fosfolipasa C, beta galactosidasa, siendo las dos primeras las más estudiadas. Tiene otras proteínas que pueden ser neutralizadas por anticuerpo (Dube et al., 2008).

El acrosoma puede visualizarse como un organelo secretor, se encuentra entre el núcleo y la membrana plasmática. La reacción acrosomal es definida como una serie de eventos de que involucran la exocitosis de los gránulos secretados; dicha reacción ocurre de forma espontánea ya sea *in vivo* o *in vitro*. Si la proporción de espermatozoides que llevan a cabo la reacción acrosomal ocurre de forma espontánea, es posible que se asocie con la detección de un daño al espermatozoide (Green et al., 1999; Visconti et al., 1999).

Son muchas las sustancias candidatas a inducir la reacción acrosomal que se presentan en el sitio de la fertilización, el fluido folicular, el *cumulus* y la zona pelúcida pueden inducir la reacción acrosomal. Son varias las moléculas bioactivas asociadas con el ovocito que se encuentran en las trompas uterinas que pueden inducir a la reacción acrosomal, incluyendo a la progesterona, sulfato glicosaminoglicano, albúmina sérica, serotonina, prostaglandinas, ácidos insaturados y una amplia variedad de enzimas. Además de los cambios bioquímicos, se presentan algunos cambios

fisiológicos producidos en el espermatozoide que se requieren para la reacción acrosomal. Por ejemplo en la capacitación espermática en ausencia de calcio, la reacción acrosomal no se realiza de forma adecuada, si subsecuentemente se le adiciona calcio la reacción acrosomal se realiza de forma sincronizada (Guraya, 2000).

La estimulación de la exocitosis en muchos sistemas celulares, como las células hormono-sensitivas, es inicialmente por la unión de sustancias inductoras o ligandos hacia un receptor específico. El estímulo secretor completo involucra la transducción de ciertas señales hacia el interior de las células vía sistema del segundo mensajero intracelular y/o cambios en la permeabilidad a los iones de la membrana, la exocitosis ocurre como consecuencia de estas señales intracelulares. Los elementos de la señal de transducción involucran la secreción de estímulos unidos a otras células presentes en la maduración del espermatozoide, y estas dos sustancias inductoras ha sido bien caracterizadas con respecto a la interacción con estos sistemas: las glicoproteínas y la progesterona; estas moléculas actúan en la superficie del espermatozoide e inducen la respuesta intracelular análoga a la exocitosis de otras células (Guraya, 2000; Dacheux, 2003).

En muchas especies incluyendo a los humanos la zona pelúcida es soluble, y es capaz de inducir además de la reacción acrosomal, la capacitación espermática. El rol de esta zona se ha estudiado de forma extensiva en los ratones, encontrándose a las proteínas ZP1, ZP2 y ZP3. Por distintos métodos se ha podido separar experimentalmente a la ZP3 de la zona proteica del ratón responsable para la adhesión e inducción de la reacción acrosomal. De acuerdo al fenómeno mediador-receptor, la zona proteica se une a la cabeza del espermatozoide. De cualquier manera se observa una deficiencia o dificultad entre las dos zonas, la del ligando y la del receptor del espermatozoide: adhesión del espermatozoide hacia la zona y la zona de inducción de la reacción acrosomal. La adhesión espermática involucra dos etapas: adhesión primaria (una unión débil) y la adhesión secundaria (una unión fuerte), la primera no es estrictamente específica a la especie, se sugiere una considerable homología, de manera que esta fase no requiere de capacitación; en tanto que la secundaria es específica de especie, requiere de la capacitación espermática y no ocurre la fertilización en los ovocitos (Gook et al., 2008).

Experimentalmente se tiene evidencias de que la adhesión primaria ocurre antes de la reacción acrosomal, en tanto que la adhesión secundaria ocurre después de ésta: 1) se observa directamente en los espermatozoides de Hamster y conejos una asociación estrecha con la zona reactiva del acrosoma espermático; 2) es necesario un intervalo de tiempo entre la adhesión primaria y la secundaria para el acoplamiento y la inducción de la reacción acrosomal con la disgregación equivalente; 3) la asociación estrecha del espermatozoide hacia la zona es reactiva al acrosoma; 4) la adherencia estrecha requiere en la reacción acrosomal la presencia de calcio (Guraya, 2000; Gook et al., 2008).

Los fragmentos proteolíticos de ZP3 unidos al espermatozoide pueden no inducir la reacción acrosomal, adquiriendo la actividad para la inducción en condiciones en las cuales los fragmentos son enlazados, por ejemplo: anticuerpos anti-ZP3. Esto se ha evidenciado con el resultado de la unión de ZP3 y la cinética de la reacción acrosomal por la agregación de los receptores de zona en la superficie del espermatozoide (Cánovas y Coy, 2008).

La señal de transducción tiene una vía muy compleja, involucra a múltiples elementos y sus múltiples efectos. Se ha estudiado a dichos elementos que se presentan en otros sistemas celulares parecidos a los presentes en el espermatozoide; entre los cuales podemos incluir a la concentración del calcio intracelular, pH, proteínas-G, el metabolismo del inositol, lipopolisácaridos y la concentración intracelular del AMPc. Una apropiada manipulación de la concentración o actividad de los intermediarios de la transducción afecta a la reacción acrosomal (Branham et al., 2006).

El aumento de calcio actúa como una señal intracelular, modulando la actividad de una variedad de sistemas enzimáticos y promoviendo la fusión de la membrana. Las células espermáticas poseen calcio en la membrana plasmática. Un segundo transporte de proteínas puede ser presentado por los cambios extracelulares de los iones sodio por calcio (Hinsch et al., 1999).

Un segundo cambio en la distribución de iones que acompaña a la reacción acrosomal, es la alcalinización del cromosoma y del citosol. El pH del acrosoma se mantiene de forma normal en aproximadamente en 4-5 y el pH del espermatozoides de 6.3 a 6.7,

comparado con el pH de 7.0 del medio fisiológico y las secreciones del aparato genital de la hembra. La activación de la acrosina tiene un pH de 5, esto tiene un significado funcional; los gradientes del pH del acrosoma y la membrana plasmática se pierden durante la zona de inducción de la reacción acrosomal en el espermatozoide del ratón y del bovino. Estos protones son transportados a través de la membrana del acrosoma y de la membrana plasmática. Presumiblemente, éste flujo de iones ocurre junto con el transporte de otros iones a través de las dos membranas para mantener las condiciones electro-neutrales. El intercambio de iones potasio por protones ocurre por medio de la membrana. Los mecanismos propuestos hasta ahora involucran el transporte de potasio, sodio, y los iones HCO_3^- . El mecanismo por el cual se realiza la unión de la molécula a la superficie del receptor puede ser acoplado por los eventos intracelulares como la vía de unión de GTP, regulada por las proteínas-G (Branham et al., 2006).

El AMPc por la actividad de dos enzimas, la adenilciclase, integrada a las proteínas de membrana; y la nucleotidil-fosfodiesterasa cíclica, es una enzima citosólica que se cataliza por la descomposición de AMPc a AMP. La actividad de la adenilciclase es estimulada después de la unión de hormonas u otros ligandos específicos para los receptores de la superficie celular, su interacción puede ser mediada por la proteína-G y ser calcio-dependiente. La actividad intracelular del AMPc involucra la activación de varias proteincinasas turnándose para la actividad o inactividad de otras enzimas y/o transporte de moléculas por la fosforilación (Branham et al., 2006).

La reacción acrosomal implica la fusión de la membrana acrosomal externa con la membrana plasmática envolvente, seguido de la liberación del contenido acrosomal.

En el ratón, al menos, el mecanismo disparador es la ZP3 de la zona pelúcida, lo cual activa un complejo mecanismo intracelular, que incluye el influjo del calcio en el citosol del espermatozoide, lo cual se piensa, inicia la exocitosis (Gook et al., 2008).

En los humanos, la fusión se inicia en el borde del capuchón acrosomal y el segmento ecuatorial del acrosoma, donde parece que las membranas son intrínsecamente menos estables. Esta región es rica en sitios de unión de calcio. La reacción acrosomal es rápida y dura de 2 a 15 minutos *in vitro*.

Previa a la reacción acrosomal, los espermatozoides de muchas especies muestran un patrón de motilidad alterado, llamado hiperactivación. De un inicial movimiento lineal progresivo, los espermatozoides empiezan a mostrar un patrón de movimiento errático, con golpes de latigazo de la cola.

Esencialmente, un componente gelatinoso del ovocito interactúa con la membrana plasmática del espermatozoide, induciendo un incremento del pH intracelular y una despolarización dependiente del calcio.

El cambio de pH causado por un flujo de hidrogeniones y un influjo de sodio es calcio independiente. Tanto el incremento de pH como la despolarización de la membrana permiten la activación de canales de calcio de la membrana plasmática, permitiendo un influjo masivo de iones calcio. Este alto nivel del calcio intracelular induce la fusión de la membrana acrosomal externa con la membrana plasmática circundante y la liberación del contenido acrosomal.

En los espermatozoides de mamíferos, la ZP2 podría ser considerada como un ligando disparador de la reacción acrosomal. La proteína G es encontrada en la membrana plasmática y en la membrana acrosomal externa. Los segundos mensajeros potenciales serían: adenilclasa, que genera AMPc, fosfolipasa C, que induce a inositol trifosfato y diaciglicerol, fosfolipasa D generadora de ácido fosfatídico, fosfolipasa A2, que genera ácido araquidónico.

La reacción acrosomal es muy variable de un espermatozoide a otro; unos la hacen pronto, otros más tarde; en algunos el disparador resulta inadecuado y en otros el mecanismo de traducción fallará en algún paso. Por eso se piensa que, los pocos espermatozoides que llegan a la masa del ovocito indican un proceso de selección (Branham et al., 2006; Gook et al., 2008).

Green (1996), luego de estudios, ha propuesto la existencia del péptido promotor de fertilización, que es un tripéptido similar a la hormona liberadora de tirotrópina y que ha demostrado ser capaz de estimular la capacitación y habilidad de fertilización en los espermatozoides epididimales del ratón.

Asimismo se ha investigado el papel de la hexoquinasa localizada subcelularmente en el espermatozoide, y que modula la capacitación y la reacción acrosomal (Naz et al., 1996, Guraya, 2000).

También se ha demostrado la estimulación del movimiento y reacción acrosomal del espermatozoide humano, por el liposoma PC12, encapsulando ATP (Skiba, 1995).

Usando el análisis del flujo citométrico de una reacción acrosomal espontánea o inducida, se obtuvo un predictor de respuesta acrosomal, a cambio con ionóforo. Es motivo de estudio el efecto de la catalasa para capacitar el espermatozoide, porque neutraliza el peróxido de hidrógeno que se produce. El ión cobre (100 microgramos/mL) interfiere no sólo en la reacción acrosomal, sino en la motilidad y viabilidad del espermatozoide (Roblerol, 1996).

La unión ZP3 - receptor del espermatozoide produce reacción acrosomal y expone el sistema proacrosín/acrosín. El proacrosín por autoactivación, se transforma en su forma proteolítica activa: acrosín. Esta es una proteasa serina que une más al espermatozoide a la zona pelúcida y condiciona su penetración. La zona pelúcida es un substrato específico y natural para acrosín y su hidrólisis y fertilización pueden ser inhibidas por anticuerpos monoclonales antiacrosín (Barroso, 1996). Algunos estudios no le dan mucha importancia al acrosín.

Cuando un espermatozoide capacitado entra en contacto con la ZP, se desencadena la reacción acrosomal, que inicia con la fusión de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa, seguida de la formación de orificios, posteriormente se forman vesículas comenzando la salida de las enzimas del acrosoma, permitiendo la penetración del espermatozoide al espacio perivitelino y se inclina de tal forma que la región ecuatorial entra en contacto con la membrana plasmática del ovocito y se presenta la fusión entre gametos.

La reacción acrosomal es un proceso membranar que termina con la fusión de la membrana plasmática y acrosomal del espermatozoide (Guraya, 2000) donde se secretan las enzimas contenidas en el acrosoma, permitiéndole penetrar a las cubiertas del ovocito y fusionarse con su membrana plasmática.

Algunos de los componentes que estimulan esta exocitosis son las glicoproteínas de la zona pelúcida (ZP3) y la progesterona, ambas funcionan como receptores del espermatozoide.

Y así después de la unión del espermatozoide con la ZP existe una serie de eventos regulados y dirigidos por la liberación de enzimas del acrosoma. Por otro lado los voltajes operados por los canales de calcio juegan un papel esencial para la unión del espermatozoide a la glicoproteína ZP3 de la zona pelúcida (Herrick et al, 2005), ya que un aumento adecuado de calcio intracelular es suficiente para que el mecanismo de reacción acrosomal se lleve a cabo.

Kodama (1996) comprobó que la capacidad de unión del espermatozoide a la zona pelúcida está incrementada, cuando una condición peroxidativa media incrementa la formación de peróxidos lipídicos. Dicho autor menciona que, una condición peroxidativa suave incrementa una formación de lípidos peroxidativos, sin modificación significativa de grupos sulfidrilos libres y parámetros de motilidad espermática, proveen potencial fertilización de espermatozoides por un incremento de su capacidad de unión a la zona pelúcida.

La reacción acrosomal no debe ocurrir antes de la unión con la ZP debido a que la maquinaria enzimática que se libera del acrosoma mediante este proceso es necesaria precisamente para la penetración de la zona. Los espermatozoides que experimentan reacción acrosomal prematura son considerados incompetentes para la fecundación, debido a que ya ocurrió la liberación de enzimas y no podrán penetrar la zona pelúcida. Además los cambios membranales que acompañan a la reacción acrosomal son indispensables para la fusión entre los gametos. Así pues, los espermatozoides que alcanzan el espacio perivitelino son siempre reaccionados y capaces de fusionarse con el ovocito (Toshimori, 2000).

12.- Proceso de ubiquitinación

Existe un nuevo método de análisis del semen denominado inmunoensayo de marcaje espermático con ubiquitina (SUTI), basado en el proceso de ubiquitinación que ocurre en el epidídimo de humano y otros mamíferos. Este proceso marca de forma específica con ubiquitina a las proteínas de la superficie de espermatozoides dañados, así como a otros contaminantes eyaculados de origen celular con ubiquitina, esto parece ocurrir durante el pasaje epididimal en ungulados, roedores y primates. Al igual que cabezas y colas espermáticas anormales, los contaminantes de origen celular, incluyendo espermátidas redondeadas y alargadas, leucocitos y residuos celulares son ubiquitinados en su superficie y por ello son reconocidos por anticuerpos anti-ubiquitina. Estas proteínas que reaccionan con ubiquitina parecen ser un marcador universal de las anomalías del semen y se propone para el diagnóstico de la infertilidad y la predicción de éxito para la fecundación *in vitro* (Sutovsky, et al., 2001b; Hodjat et al., 2008).

13.- Ubiquitina

La ubiquitina es una pequeña proteína formada por 76 aminoácidos, elevada estabilidad, ausencia de enlaces disulfuro, excelente solubilidad y predominio de estructuras secundarias con enlaces de hidrógeno y tiene una masa molecular de aproximadamente 8,6 KDa (Sutovsky 2003; Cascales, 2005; Hodjat et al., 2008). La ubiquitina es un marcador proteolítico universal que tiene como blanco a los péptidos para la destrucción en proteosomas o lisosomas. Es secretada en modo apócrino por células epiteliales epididimales ligadas a la superficie morfológicamente anormal del espermatozoide y otros contaminantes del semen de origen testicular, incluyendo residuos corporales, residuos de gotas citoplasmáticas, inmaduración de células espermátogénicas y células somáticas (Sutovsky, et al., 1999b).

Controla una variedad de eventos biológicos como la progresión del ciclo celular, degradación y reciclado de las proteínas. En general, los polisubstratos ubiquitinados ligados a las cadenas de poliubiquitina son marcados por los organelos celulares, así como los lisosomas y proteosomas para la degradación, en donde las cadenas poliubiquitinadas son partidas por las enzimas específicas reciclando ubiquitina. El

proceso de ubiquitina en cuanto a las proteínas blanco, se activa a través de las vías enzimáticas, incluyendo varias ubiquitinas ligasas E1-E3 en los mamíferos. Se ha descubierto una variedad de elementos envueltos en el sistema de ubiquitina se han descubierto en los testículos, epidídimo y plasma seminal (Sutovsky et al., 1999a, 2001a; Baarends et al., 1999a; Bebington et al., 2001; Toshimori, 2003).

Mediante la degradación proteica, las células pueden rápidamente eliminar una proteína que a su vez, regulaba otra función. Esto es lo que ocurre con un factor de transcripción necesario para la expresión de un gen particular. Además, esta forma de control es muy efectiva, ya que la eliminación de una proteína reguladora asegura que el proceso regulador efectuado por esa proteína se ha desconectado. En este contexto, una estrategia alternativa es simplemente inactivar las proteínas no deseadas, cambiando su conformación (Cascales, 2005).

Varias moléculas de ubiquitina se anclan a la proteína a eliminar y una vez ubiquitinadas son degradadas proteolíticamente, en un proceso dependiente de ATP por un complejo multiprotéico denominado proteosoma 26S; antes de que esto tenga lugar, las unidades de ubiquitina se liberan para ser reutilizadas. La ubiquitina puede marcar incluso proteínas de la membrana de la célula, por ejemplo receptores, para que sean eliminadas de la membrana (Cascales, 2005; Vázquez, 2003).

La ubiquitina está presente en el citoplasma celular como un componente inactivo y es activado por una enzima específica E1 al mismo tiempo que se adhiere al residuo de lisina de la proteína a ser marcada. Las proteínas que realizan esta unión son el acarreador de ubiquitinas E2 y la ubiquitina ligasa E3. Después de la adhesión de una sola molécula de ubiquitina al residuo de lisina del sustrato (monoubiquitinación), se puede adherir una o más moléculas la cual forma una larga cola de residuos. (Sutovsky et al., 2000).

Esta reacción requiere la hidrólisis de ATP y se cataliza por un conjunto de ubiquitinas portadoras y ligasas (Ciechanover, 1994; Hershko y Ciechanover, 1998; Sixt y Dahlman, 2008). Los modelos comunes de ubiquitinación incluyen monoubiquitinación, diubiquitinación, y tetraubiquitinación, todos ellos aumentan el peso molecular de un sustrato por un múltiplo de 8.5 kDa (Pickart, 1998).

La relación entre la degradación de una proteína y su síntesis es lo que determina la concentración de esa proteína dentro de la célula. De este recambio proteico se deduce que algunas proteínas tienen una vida media larga y otras una vida media corta. Las primeras constituyen la mayoría de las proteínas celulares, mientras que las de vida corta son típicamente proteínas reguladoras clave y proteínas anormales o defectuosas. Las proteínas anormales suelen encontrarse parcialmente plegadas (Cascales, 2005).

La ubiquitina actúa a modo de etiqueta para que la proteína pueda ser reconocida por el proteosoma para su degradación en un proceso denominado ubiquitinación. Un proceso antagónico es aquel catalizado por enzimas antiubiquitinantes que eliminan la ubiquitina de las proteínas. Alrededor de 50 o más moléculas de ubiquitina se unen en fila a una proteína formando una cadena de multiubiquitina en la cual la Lys 48 de cada ubiquitina forma un enlace isopeptídico con el carboxilo terminal de la siguiente ubiquitina, al parecer este arreglo es esencial para la degradación de algunas proteínas. La simple hidrólisis del enlace peptídico de las proteínas no necesita energía, sin embargo, la ubiquitina funciona de manera dependiente del ATP (Cascales, 2005; Vázquez, 2003).

a) Conjugación

La ubiquitina se une a la enzima activadora de la ubiquitina E1, mediante un enlace tioéster de alta energía, entre el carboxilo terminal del residuo de glicocola y el residuo de cisteína del sitio activo del enzima E1 (E1-S-Ub). En esta reacción la enzima E1 hidroliza el ATP a AMP y PPI, con la intermediaria formación de un E1-ubiquitin adenilato. La ubiquitina así activada se transfiere entonces desde el enzima E1 a un miembro de una familia denominada proteína transportadora de ubiquitina (ubiquitin carrier protein) E2, formando un enlace tioéster similar al formado anteriormente con el enzima E1 (E2-S-Ub). La ubiquitina, de esta manera, puede ser transferida directamente desde el enzima E2 al sustrato proteico, al que se une mediante un enlace isopeptídico con el grupo ϵ de un residuo amino de lisina (K) del sustrato. Otras reacciones de conjugación requieren la intervención de una tercera enzima, la ubiquitina ligasa (E3). E3 se une a la proteína sustrato y también a E2 para formar un complejo E2-E3-sustrato. La formación y reconocimiento de dicho complejo tiene una

alta especificidad de sustrato para la cascada de conjugación. (Cascales, 2005; Vázquez, 2003; Jesenberg y Jentsch, 2002).

La enzima E1, activador de la ubiquitina, es esencial en la ubiquitinación y degradación proteica. Su inactivación a temperatura elevada causa la pérdida de un 80 por 100 de la proteólisis. Existe una sola E1, producto de un solo gen. La enzima E2 es la proteína transportadora de la ubiquitina. Existen 50 tipos diversos, que son polipéptidos pequeños de unos 150 residuos que contienen en su sitio activo un residuo de cisteína, además de presentar una identidad elevada entre ellos. El enzima E3, ubiquitin-ligasa, es un polipéptido de 225 kDa, que reconoce el objetivo. E3 actúa a modo de puente de interacción entre E2 y el sustrato. Existen más de 100 tipos de E3 con especificidad para un solo sustrato. E3 se muestra en dos formas: con dominio HECT y con dominio RING finger, ambos poseen también dominios de enlace a E2.

Las ligasas HECT-E3 sirven como adaptadores para unir el sustrato a una E2 específica, formando un intermediario en el cual la ubiquitina se une a la cisteína conservada. El dominio RING finger de la ligasa E3 debe su denominación a: Really Interesting New Gene. Contiene una estructura en doble bucle rica en cisteína formados por dos átomos de Zn. Este dominio actúa a modo de soporte donde se unen el enzima y el sustrato o subunidades juntas. Las ligasas RING finger E3 incluyen tanto las de cadena sencilla como los grandes complejos APC y SCF implicados en el ciclo celular (Cascales, 2005).

Muchas proteínas localizadas en la membrana plasmática han mostrado ser ubiquitinadas. En 1986 se encontraron las primeras proteínas ubiquitinadas de la membrana plasmática, revelando dos secuencias aminotermiales. Uno de ellos correspondió a la sucesión de ubiquitina. Desde entonces, se encontraron numerosas proteínas de superficie celular conjugadas a ubiquitina (Strous y Govers, 1999).

El proceso de conjugación de la ubiquitina, demostrado por Avram Hershko e Irwin Rose (Premio Nobel de Química por el descubrimiento del papel de la ubiquitina en 2004), es reminiscencia de la activación de los aminoácidos y ocurre en tres etapas:

- 1) En una reacción dependiente de ATP, el carboxilo terminal de la ubiquitina se conjuga mediante un enlace tioéster con el enzima activadora de la ubiquitina E1.

2) La ubiquitina se transfiere a un grupo SH de la enzima conjugadora, transportadora de ubiquitinas (E2).

3) La ubiquitina ligasa E3 transfiere la ubiquitina activada en E2 a un grupo ϵ -amino de una lisina de una proteína sustrato formando un enlace isopeptídico. Al parecer E3 es clave en la selección de la proteína a degradar. El enlace covalente entre la ubiquitina y el sustrato proteico requiere la activación del grupo carboxilo terminal de la ubiquitina (Cascales, 2005; Vázquez, 2003; Jesenberg y Jentsch, 2002; Sixt y Dahlman, 2008).

b) Proteólisis

La vía de la ubiquitina-proteosoma se encuentra implicada en el intercambio intracelular de las proteínas y juega un papel importante en la degradación de proteínas reguladoras de vida corta. Esta importante vía se encuentra involucrada en la regulación de procesos celulares críticos, tales como: control del ciclo celular, reparación del DNA, oncogénesis, catabolismo de proteínas anormales, modulación de la respuesta inmune e inflamatoria, modulación de receptores de superficie y canales iónicos, procesamiento de antígenos, biogénesis de los ribosomas, transcripción, infección vírica, degeneración neural y muscular, diferenciación celular y respuesta al estrés (Cascales, 2005).

La proteólisis está mediada por proteasas dependientes de ATP, esenciales, intracelulares y ubicuas, denominadas proteosomas o proteasas multicatalíticas. Los proteosomas degradan una amplia variedad de proteínas citoplásmicas, nucleares y de membrana, que hayan sido marcadas para su degradación mediante la inserción de moléculas de ubiquitina (Baccetti, et al., 1996; Hershko y Ciechanover, 1998). Los proteosomas de eucariotas son grandes complejos proteicos de alrededor de 2,500 kDa, con arquitectura modular (Baumeister, et al., 1998; Sixt y Dahlman, 2008). El proteosoma es una proteasa multimérica, que cataliza el paso final de la degradación de las proteínas intracelulares, vía de ubiquitina-proteosoma. El proteosoma existe en múltiples formas en las células eucariotas. En todas las isoformas se encuentra el núcleo catalítico conocido como proteosoma 20S. La hidrólisis del ATP se requiere para el desplegamiento de la proteína que le permita la accesibilidad al núcleo catalítico. El núcleo catalítico del complejo, el proteosoma 20S, de 720 kDa, es una partícula cilíndrica que consiste en cuatro anillos con siete subunidades diferentes cada

uno, que están presentes en dos copias y en una sola localización, de forma que la partícula presenta una simetría doble. Los cuatro anillos heteroheptaméricos yuxtapuestos están formados por subunidades α y β , unidas axialmente formando una estructura α - β - β - α , con centros. La forma del proteosoma que reconoce y degrada a las proteínas poliubiquitinadas es el proteosoma 26S (Vázquez, 2003).

La diversidad de la maquinaria ubiquitina-proteosoma la proporciona las múltiples formas de E3 con capacidad para reconocer a un grupo específico de sustratos.

El descubrimiento de la cascada compleja de la vía ubiquitina - proteosoma supuso una revolución y a partir de aquí, la degradación de las proteínas ha adquirido una nueva dimensión. En la actualidad se sabe que la degradación de las proteínas celulares mediante el sistema ubiquitina es un proceso complejo, enormemente controlado en el tiempo y estrictamente regulado que se encuentra involucrado en numerosos procesos básicos de la vida y la muerte de la célula, en la salud y la enfermedad (Cascales 2005; Sixt y Dahlman, 2008).

Las proteínas degradadas por dicho sistema se conjugan covalentemente con la ubiquitina, por medio de un proceso dependiente de ATP, para posteriormente ser degradadas por el proteosoma o complejo proteásico multifuncional (SPDU). El SPDU involucra, por tanto, a diferentes enzimas tales como: ligasas, enzimas de activación y conjugación, peptidasas e isopeptidasas, además del complejo proteosómico (Cascales, 2005).

La forma del proteosoma que reconoce y degrada a las proteínas poliubiquitinadas es el proteosoma 26S. Este complejo multienzimático de 2.500 kDa de masa molecular está formado por el núcleo catalítico de 20S, antes mencionado y dos copias de un complejo regulador de 19S. Se encuentra tanto en el núcleo como en el citoplasma y consiste de al menos 20 tipos de subunidades y posee al menos cinco tipos diferentes de actividades de peptidasa que parten después de residuos básicos, hidrofóbicos o acídicos (Vázquez, 2003).

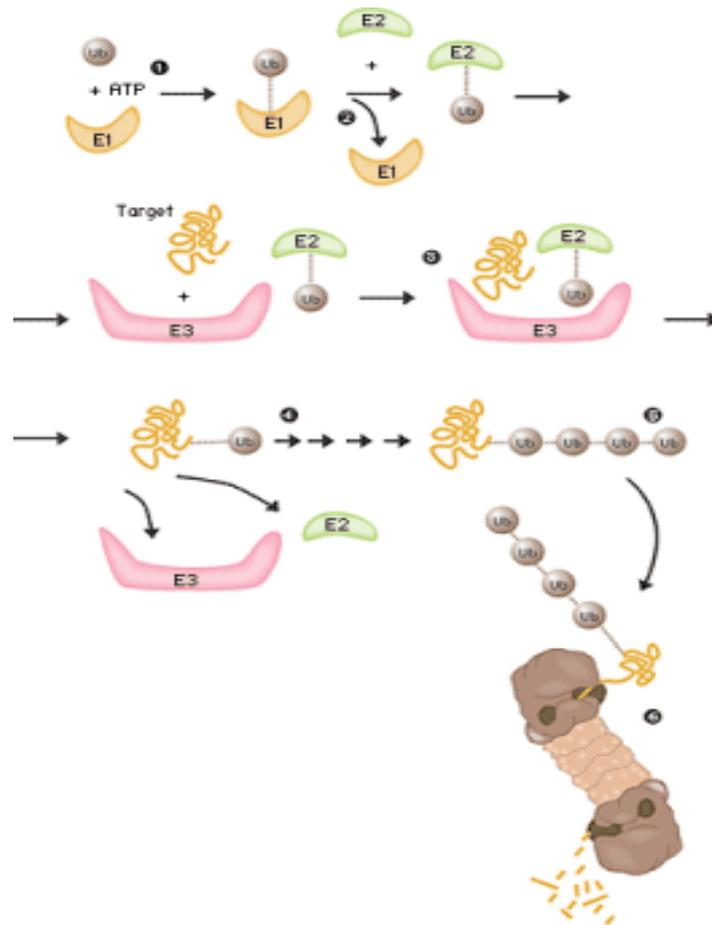


Figura 3. Proceso de ubiquitinación.

- La ubiquitina es transportada por una enzima (activador de ubiquitina) conocida como E1 que la transfiere a una segunda enzima E2 (conjugador de ubiquitina).
- Una tercera enzima E3 (ligasa de ubiquitina) entra en escena para transferir la ubiquitina desde la enzima E2 hasta la "proteína diana" que de esta manera comienza su proceso de marcado.
- El proceso anterior se repite varias veces hasta que la proteína diana acumula, al menos, cuatro moléculas de ubiquitina, momento en el que ya está lista para su degradación.
- La degradación es realizada por el proteosoma, una estructura en forma de barril, que tritura la proteína liberando los aminoácidos y las moléculas de ubiquitina que quedan disponibles para ser reutilizadas.

La proteólisis por el proteosoma no es arbitraria, sigue un método. Aunque las unidades catalíticas actúan como endopeptidasas, porque no son las uniones terminales las que se rompen, el modo de acción preferido es por roturas sucesivas comenzando cerca del N-terminal y produciendo fragmentos de 4 a 25 aminoácidos, con una media de 8 a 9 residuos. Como la proteólisis se verifica siguiendo un proceso, las roturas se verifican de manera secuencial, una tras otra.

El mecanismo general de degradación de las proteínas poliubiquitinadas es:

- 1) Reconocimiento y unión del sustrato poliubiquitinado por el receptor en el complejo 19S.
- 2) Despliegue mecánico de la proteína sustrato, dependiente de ATP.
- 3) Introducción de la proteína desplegada en el núcleo 20S después de haberse desprendido la cadena de poliubiquitina por acción de isopeptidasas.
- 4) Rotura de la proteína en fragmentos de 8 a 9 residuos.
- 5) Salida de los péptidos por el extremo 19S opuesto (Cascales, 2005).

La diversidad de la maquinaria ubiquitina-proteosoma la proporciona las múltiples formas de E3 con capacidad para reconocer a un grupo específico de sustratos.(Sixt y Dahlman, 2008)

c) Apoptosis

La vía de la ubiquitina/proteosoma es la principal ruta no lisosomal para la degradación proteica en eucariontes. Es el instrumento de varios procesos celulares, así como la progresión del ciclo celular, transcripción y proceso del antígeno. Se reporta que los componentes de la ubiquitina/proteosoma y las vías apoptóticas actúan profunda y recíprocamente, demostrando que la maquinaria de la ubiquitinación tiene un papel importante en el apoptosis. La identificación de agentes que inhiben la actividad del proteosoma incitó los estudios para investigar el requerimiento del sistema de ubiquitina/proteosoma en la apoptosis. En la mayoría de las líneas celulares, los inhibidores de proteosoma activan la apoptosis (Jessenberg y Jentsch, 2002). Durante la apoptosis, la activación de la caspasa origina la rotura de tres subunidades específicas del complejo regulador 19S del proteosoma: Rpt5 y Rpn10, cuyas misiones son el reconocimiento de los sustratos poliubiquitinados, y Rpn2 que con Rpn1 mantienen unidas la tapa y la base del complejo 19S. Estas roturas mediadas por la caspasa inhiben la degradación proteosómica de sustratos dependientes o independientes de la ubiquitina, incluyendo moléculas proapoptóticas, facilitando así la ejecución del programa apoptótico (Cascales, 2005; Chen, et al., 2000; Sixt y Dahlman, 2008).

14.- Ubiquitinación en la espermatogénesis

La actividad del sistema de ubiquitina es relativamente alta durante la espermatogénesis. Así, el sistema de ubiquitina puede implicarse en la degradación y reciclado de la proteína o en la eliminación de células defectuosas, así como la apoptosis (Toshimori, 2003). La proteólisis dependiente de ubiquitina juega un papel en la diferenciación celular espermática dentro de los túbulos seminíferos testiculares, y en el control del ciclo celular a lo largo de la espermatogénesis, ovogénesis, fertilización, y en el desarrollo embrionario. Además, la ubiquitina surge como un importante factor en la calidad del semen epididimal y un regulador de herencia mitocondrial.

La ubiquitina conjuga las enzimas E1, E2, y UBC4, reciclando la proteína PGP 9.5, siendo expresadas en la gónada masculina durante la diferenciación celular por las células de Sertoli, espermatogonia, espermaticitos, y espermátides (Baarends et al., 1999a; Bebington et al., 2001; Rajapurohitam et al., 1999).

La reducción dramática del volumen citoplasmático ocurre durante la fase haploide de la espermatogénesis, es decir, alargamiento del espermátide, cuando la mitocondria junto con la mayoría del citosol se rechazan y forma un cuerpo residual destinado a la resorción por las células de Sertoli en los testículos. La ubiquitinación de la mitocondria de la espermátide se basa en la colocación de ubiquitina en la mitocondria de espermátides y de espermias maduros (Sutovsky et al., 1999b, 2000; Hodjat et al., 2008). La expresión de ubiquitina en el espermátide redondo y en el espermia maduro se informó en los gallos (Agell y Mezquita, 1988), toros (Sutovsky et al., 2000), hombres, y ratones (Tipler et al., 1997).

La ubiquitina está presente en el plasma seminal humano (Lippert et al., 1993) en los espermatozoides defectuosos en humanos y animales que son ubiquitinados durante el transito epididimal (Sutovsky et al., 2001a,b). Aunque las glándulas sexuales accesorias podrían ser una fuente de ubiquitina en el plasma seminal, es probable que la mayoría se origine en el epidídimo, sugerencia apoyada por los niveles bajos de reactividad cruzada de anti-ubiquitina en la próstata humana y animal, glándula bulbouretral, fólculo seminal, y en la vesícula seminal.

No está claro cómo los espermatozoides defectuosos se reconocen por la maquinaria de la ubiquitinación y cómo están dispuestos. Las mitocondrias paternas son etiquetadas con la ubiquitina en los testículos (Sutovsky et al., 1999b, 2000) y esta etiqueta de ubiquitina podría reconocerse por la maquinaria de ubiquitinación epididimal en el espermatozoide anormal dónde los disulfuros se unen a membranas mitocondriales suspendidas durante el tránsito epididimal. Esto es consistente con la acumulación de substratos con ubiquitina en el fragmento inmóvil del semen, que contienen la mayoría de los espermatozoides defectuosos después de la separación del fluido seminal (Hodjat et al., 2008). A menudo, la mitocondria espermática es la única estructura con una superficie ubiquitinada en el espermatozoide defectuoso aislado del compartimiento superior epididimal o cabeza del epidídimo (Sutovsky et al., 2001; Hodjat et al., 2008).

Las mutaciones en los componentes del sistema de ubiquitina que lleva a la infertilidad del macho y/o hembra en modelos animales, también pueden ocurrir en el humano. Por ejemplo, la histología de testículos de ratones es semejante a la histología de biopsias de los testículos de varones infecundos con el oligo-idiopático-asteno-teratozoospermia. Además, la estructura primaria de la enzima puesta en código por HR6B muestra 100% de conservación entre el ratón y el humano. No puede excluirse que inactivando mutaciones de HR6B pueden bajar algunos casos de infertilidad en el varón. Además, el gen de HR6A está involucrado en ciertos casos de infertilidad de la mujer, por lo tanto, el sistema de ubiquitina parece tener a menudo funciones especializadas en la generación de gametos en machos y hembras (Baarends, 1999b; Ozanon, 2005).

Actualmente se han desarrollado diferentes tipos de técnicas de selección espermática, cuyo principal objetivo es limpiar el semen de su propio plasma seminal recuperar a los espermatozoides que ofrezcan una mejor calidad para la fecundación.

15.- Ubiquitinación del espermatozoide como marcaje de calidad

La degradación de las proteínas dependientes de ubiquitina, es un sistema que está involucrado en la degradación de proteínas, tanto funcionales como estructurales en tipos celulares muy diversos. Las proteínas degradadas por dicho sistema, se conjugan

covalentemente a la ubiquitina por medio de un proceso dependiente de ATP, para posteriormente ser degradadas por el proteosoma o también llamada: complejo proteásico multifuncional (SPDU), en cual involucra a diferentes enzimas, tales como: ligasas, enzimas de activación y conjugación, peptidasas, isopeptidasas, además del complejo proteosómico.

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., 1999) y en etapas posteriores (Hodjat et al., 2008). 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 acompañada 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 y permitir el empaquetamiento dentro de la cabeza del espermatozoide, en este proceso puede estar también involucrado el sistema Ub (Baarends et al., 1999). Las enzimas E1 y E2, que participan de manera importante en el sistema de ubiquitinación, están involucradas en la espermatogénesis (Grootegoed et al., 1998), parece ser que la mitocondria del espermatozoide está marcada para su degradación por ubiquitina durante la espermatogénesis y son destruidas por la maquinaria proteosomal del ovocito fecundado (Sutovsky et al., 1999). Se han identificado sub unidades proteosomales específicas en testículo de *Drosophila melanogaster* que es la mosca de la fruta (Belote et al., 1998), y proteosomas activos de espermatozoides humanos (Tipler et al., 1997). Cabe resaltar que uno de los sitios de mayor concentración de Ub, es el plasma seminal del humano, sin embargo, sus funciones no son tan claras (Sutovsky et al., 1999).

La ubiquitinación es un mecanismo universal, en el que participan las proteínas ubiquitina, que tienen la capacidad de reciclarse y de unirse covalentemente a otras proteínas, las cuales se presume han perdido su funcionalidad, estas últimas sufren una proteólisis en el lisosoma o el proteosoma (Ciechanover, 1994). Estudios realizados (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 que ocurre en el epidídimo,

específicamente durante su paso por la rete testis a la cabeza del epidídimo en los toros, es cuando se presenta un abrupto incremento en el número de espermatozoides ubiquitinados (Sutovsky et al., 2001b). La ubiquitina se expresa en el epitelio epididimario y se acumula en las microvellocidades apicales, un sitio que posee propiedades de secreción de proteínas apócrinas, esto permite suponer que la ubiquitinación de la superficie del espermatozoide pueda ser el medio de inmovilización y/o reabsorción de espermatozoides defectuosos durante su paso por el epidídimo. Como el mecanismo propuesto permite que un cierto porcentaje de espermatozoides ubiquitinados o defectuosos estén presentes en el eyaculado, se ha propuesto que 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 humana, Sutovsky y cols. (2004), realizaron un estudio en el cual examinaron la relación entre el contenido de ubiquitina en el espermatozoide y los parámetros clásicos de un espermograma de varones de una población clínicamente infértil por diferentes etiologías, el contenido de ubiquitina se midió por citometría de flujo mediante la técnica de inmunoensayo para ubiquitina-espermatozoide (sperm-ubiquitin tag immunoassay, SUTI), para lo cual se utilizó un anticuerpo primario anti ubiquitina de humano (KM691) y un anticuerpo secundario anti ratón-FITC (Ozanon, 2005). Este grupo encontró que los pacientes infértiles mostraron espermatozoides ubiquitinados con valores altamente significativos, por lo que concluye que el incremento en la ubiquitinización espermática 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 de semen humano y se sugiere su uso en otras especies. La prueba SUTI confirma la mala calidad de las muestra de semen relacionado con parámetros clínicos muy pobres, aunque también encontraron valores altos de espermatozoides ubiquitinados en algunos pacientes, cuyas muestras de semen aparentemente tuvieron buenos parámetros espermáticos (Sutovsky et al., 2004).

JUSTIFICACIÓN

La productividad de todas las especies de interés zootécnico está determinada por factores que influyen en mayor o menor grado sobre su rendimiento, de ellos los aspectos reproductivos son de fundamental importancia para el avance zootécnico de cada especie y por ello es necesario emprender programas que conduzcan al conocimiento de los factores que participan y regulan el proceso productivo.

En las últimas décadas la investigación de los mecanismos moduladores de la expresión reproductiva en lo general de los procesos previos a la fecundación, en este caso la capacitación y la reacción acrosomal van sentando las bases para el control y manipulación de procedimientos de reproducción asistida, como inseminación artificial, congelación de semen, entre otros (Ramírez, 2008).

A pesar de los esfuerzos realizados en la búsqueda de conocimientos particulares de estos procesos de control de calidad en el espermatozoide, aún existen grandes interrogantes alrededor de estos temas. Resulta importante e interesante conocer los mecanismos por los cuales se seleccionan los espermatozoides que se eyacularán.

La evaluación de sementales para seleccionar aquellos aptos para ser usados en esta práctica de la reproducción asistida, demandan cada vez más de técnicas precisas que permitan predecir la fertilidad de cada dosis para la inseminación exitosa. Desafortunadamente hasta el momento la calidad de la muestra se califica mediante el uso de espermogramas convencionales que no evalúan características de los espermatozoides que garanticen o permitan predecir su capacidad fertilizante.

En varias especies de mamíferos incluyendo al humano (Ozanon, 2005), la infertilidad en el macho está asociada a un contenido más alto de proteínas de la membrana plasmática del espermatozoide que se unen a ubiquitina, y pueden ser detectadas con anticuerpos anti-ubiquitina (Sutovsky et al., 2001a, b). Estas proteínas que son marcadas por ubiquitina parecen ser secretadas por el epitelio epididimario (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 algunos de estos son fagocitados por las células claras del epitelio epididimario (Hermo et al., 1988).

Actualmente la información que existe sobre la ubiquitinación de los espermatozoides no es suficiente para conocer cuál es su participación sobre la fisiología del espermatozoide y mucho menos si se trata de una relación con la incapacidad para la fecundación, o bien que solo sea parte de un proceso de maduración del espermatozoide que lo prepara para la capacitación y la reacción acrosomal, ya que como sabemos uno de los eventos fisiológicos más importantes en estos últimos procesos es precisamente la remoción de proteínas (Dacheux, 2003).

En resumen, no se tiene claridad sobre el significado que tiene la ubiquitinación de espermatozoides en una muestra de eyaculado, ni el sitio del aparato reproductor masculino en el que adquieren la marca con ubiquitina, por tal motivo con éste trabajo pretendemos saber si los espermatozoides marcados con ubiquitina procedentes de eyaculados y de cola de epidídimo responden a inductores de capacitación y reacción acrosomal, y si existe correlación entre el número de espermatozoides ubiquitinados con los otros parámetros medidos en un espermograma, por último se pretende conocer si el número de espermatozoides ubiquitinados en una muestra influye en la cantidad de espermatozoides que se capacitarán y llevarán a cabo la reacción acrosomal bajo condiciones *in vitro*.

El desarrollo de técnicas como ésta que pueden ser incorporadas para evaluar la fertilidad masculina y de sementales en la producción animal puede ser de gran utilidad, además de apoyar los programas de reproducción asistida, así como en el diagnóstico y tratamiento de algunos trastornos de la fertilidad.

OBJETIVO GENERAL

Se pretende conocer el porcentaje de espermatozoides que presentan ubiquitinación de las proteínas de la membrana plasmática en espermatozoides de conejo, en muestras de eyaculado y de cola de epidídimo, durante la capacitación y reacción acrosomal in vitro.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Inducir capacitación y reacción acrosomal en las muestras de espermatozoides obtenidas de eyaculado y de cola de epidídimo.
- 2.- Determinar el porcentaje de espermatozoides que se marquen con el anticuerpo anti-ubiquitina en muestras de eyaculado obtenidos de conejos por vagina artificial y de cola de epidídimo.
- 3.- Determinar si existe correlación entre el porcentaje de células positivas a ubiquitina y el porcentaje de células capacitadas y reaccionadas.

HIPÓTESIS

Los espermatozoides marcados con ubiquitina y los no marcados, tienen la misma oportunidad de realizar la capacitación y reacción acrosomal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron conejos machos Nueva Zelanda Blancos, sexualmente maduros, con fertilidad probada, de edad entre 12 y 18 meses y con un peso corporal de 3-4 kg. Los animales permanecieron en el Bioterio, 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

Eyaculado

Se obtuvieron eyaculados de conejo con el uso de vagina artificial confeccionada en el laboratorio de Bioquímica de la Reproducción de la UAM-X. Para eliminar detritos celulares y células de descamación los eyaculados, se pasaron a través de un gradiente de Percoll discontinuo (95-75% diluido en medio Brackett (30 mM HEPES, 5 mM KCl, 100 mM NaCl, 21 mM lactato de sodio, 2.5 mM piruvato de sodio, ajustado a un pH de 7.6) (Suárez et al., 2002) y posteriormente se centrifugaron a 900 x g por 20 min. Los espermatozoides se recuperaron de la interfase del gradiente y se lavaron por centrifugación a 500 x g por 5 min.

Cola de epidídimo

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical, después los testículos se disecaron, se ligaron las venas y el conducto del epidídimo con hilo de algodón, para perfundir el paquete vascular con 5 ml de solución salina fisiológica NaCl 0.9 M, pH 7.4 a 37° C, con el propósito de evitar la contaminación de las muestras con sangre.

Posteriormente se separaron los epidídimos de los testículos y se disecaron las caudas. Los espermatozoides de esta región se obtuvieron por perfusión, introduciendo una cánula por el conducto deferente y dejando correr 3 ml de medio capacitante. La suspensión de espermatozoides se lavó centrifugándolos a 500 x g por 5 min.

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Dentro del ensayo se eliminaron las muestras contaminadas con sangre así como las que no mostraron un porcentaje de viabilidad apropiado menor al 80% (Belsey et al., 1980), de manera que sólo se utilizaron muestras con movimientos progresivos calificados como buenos y excelentes.

El porcentaje de espermatozoides vivos se obtuvo usando la técnica de tinción supravital Eosina-Nigrosina (Swanson et al., 1951) con esta tinción los espermatozoides muertos adquieren una coloración roja mientras que los vivos no se tiñen.

Capacitación

Tanto en espermatozoides de eyaculado como de cola de epidídimo se indujo la capacitación. Una vez seleccionados y lavados, se re-suspenden en Medio Brackett (30 mM HEPES, 5 mM KCl, 84 mM NaCl, 21 mM lactato de sodio, 2.5 mM piruvato de sodio, 13.9 mM, 2.5 mM CaCl₂, glucosa, 1 mg/ml de albúmina de suero bovino, ajustado a un pH 7.6), a una concentración final de 2.5×10^7 espermatozoides/ml. La concentración espermática se calculó contando los espermatozoides en un hemocitómetro (cámara de Neubauer). Las suspensiones espermáticas se realizaron en tubos cónicos de polipropileno, se incubaron en una atmósfera de 5% CO₂ / 95% aire durante 6 h a 37° C con agitación constante. Cada 2 horas se tomaron una muestra de 20 µl para realizar el estudio fluorométrico con la ubiquitina. A las 6 horas de incubación, se tomaron aparte dos alícuotas más de 20 µl para medir el porcentaje de espermatozoides vivos por el método de eosina/nigrosina y en la otra se cuantificó el porcentaje de espermatozoides capacitados, mediante la tinción de clorotetraciclina (CTC) (Green et al., 1994).

Reacción acrosomal

Después de las 6 horas de capacitación de las muestras de eyaculado y de cola de epidídimo, se tomaron dos alícuotas de 300 µl cada una. Una se trató con progesterona (Sigma) 3.18 µM (concentración final en DMSO 0.1%) (Sabeur et al., 1996) y la segunda alícuota fue usada como control por lo cual no se le adicionó ningún inductor.

Las muestras se incubaron durante los 0, 15, 30, 45 y 60 min y para cada tiempo se tomaron alícuotas de 20 μ l para el análisis de fluorescencia con ubiquitina. Para verificar la reacción acrosomal en los espermatozoides incubados en las condiciones mencionadas, en cada muestra, se realizó la tinción de azul brillante de Coomassie (CBB) (Miller et al., 1993). La tinción azul de la región del acrosoma indica espermatozoides intactos o no reaccionados. Cuando se observa una disminución importante de la tinción en la región acrosomal, los espermatozoides se consideraron reaccionados.

Detección de Ubiquitina

El porcentaje de espermatozoides unidos a ubiquitina se cuantificó mediante microscopía de fluorescencia usando el kit comercial de sperm-ubiquitin tag immunoassay (SUTI). Los espermatozoides 20 μ l (150 000 spz) de eyaculado y los de cola de epidídimo, se re-suspendieron en 500 μ l del medio KMT (Sutovsky et al., 2000), y se incubaron con el anticuerpo anti ubiquitina (MK-12-3, 1:100) durante 40 minutos a 37° C. La unión del anticuerpo anti ubiquitina se detectó mediante la unión de un anticuerpo secundario marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (1:80), para lo cual necesitaron 40 minutos de incubación con el anticuerpo. Las incubaciones y los lavados se hicieron en medio KMT en cajas de Petri manteniendo la temperatura a 37° C. Una vez realizada la incubación se procedió a realizar los frotis, para lo cual se utilizaron porta objetos con poly-L-lisina y se sellaron con barniz de uñas transparente, para inmediatamente después hacer el análisis en el microscopio de epifluorescencia. El porcentaje de espermatozoides marcados con ubiquitina se determinó contando en diferentes campos un total de 200 espermatozoides.

ESTUDIO CITOMÉTRICO

Una vez marcados los espermatozoides, se tomaron alícuotas de 20 μ l (150,000 células) tanto de eyaculado como de cola de epidídimo con los anticuerpos contra ubiquitina a diferentes tiempos de incubación (durante la capacitación a las 0, 2, 4, y 6 horas; y durante la reacción acrosomal a los 15, 30, 45 y 60 minutos), y fueron evaluados haciendo uso de un citómetro de flujo FACSort (Becton Dickinson System, San José, CA). El valor de FSC-H será de 44 y el de FSC E00.

La intensidad de fluorescencia emitida a 530 nm (FL1, corresponde al anticuerpo) y se cuantificarón 10 000 espermatozoides; estos datos se analizaron con el programa Lysys II. Los datos de fluorescencia de las células se obtuvieron en una gráfica de histogramas para representar la intensidad de la fluorescencia 1 (FL1) de todas las muestras.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se usó el paquete Info Stat. Los datos se analizaron con ANOVA de dos vías y prueba t de Student. El valor de significancia fue de $p < 0.05$.

RESULTADOS

A cada uno de los experimentos se les realizó un espermograma clásico para poder descartar las muestras que no cumplieran con los requisitos básicos de calidad (viabilidad y movilidad masal) se descartó un 20% de las muestras; además a cada una de las muestras aceptadas se les indujo capacitación con medio Brackett (durante 6 hrs.) y la reacción acrosomal con progesterona (durante 1hr.), todo en condiciones *in vitro*.

Volumen, viabilidad, concentración, motilidad

El volumen de las muestras de eyaculado en promedio fueron de 0.52 ± 0.24 ml, el volumen de muestra recuperado estuvo entre 0.7 y 1 ml. (Cuadro 1)

En cuanto al porcentaje de viabilidad, los resultados obtenidos en muestras de eyaculado fueron de $86\% \pm 4.8$ y en las muestras de epidídimos fueron de 80 ± 3.2 %. (Cuadro 1)

El promedio de concentración obtenido en muestras de eyaculado fue de $206 \pm 66 \times 10^6$ /ml y el de las muestras de epidídimo fue de $193 \pm 43 \times 10^6$ /ml. (Cuadro 1)

El promedio de porcentaje de motilidad en muestras de eyaculado fue de 77.5 ± 2.7 % y en las muestras de epidídimo fue de 74 ± 6.6 %. (Cuadro 1)

Cuadro 1. Resultados obtenidos: volumen (ml), motilidad (%), viabilidad (%), y concentración de espermatozoides/ml en muestras de eyaculado y de epidídimo.

	Eyaculado	Epidídimo
Volumen	0.52 ± 0.10 ml	1 ml
Viabilidad	86 ± 4.8 %	80 ± 3.2 %
Concentración	$206 \pm 66 \times 10^6$ /ml	$193 \pm 43 \times 10^6$ /ml
Motilidad	77.5 ± 2.7 %	74 ± 6.6 %

Los datos en el Cuadro, son el promedio y error estándar. n=6

Capacitación

Para detectar el porcentaje de espermatozoides capacitados se realizó una tinción con clorhidrato de tetraciclina, en la Figura 1 se muestra un ejemplo de dicha tinción.

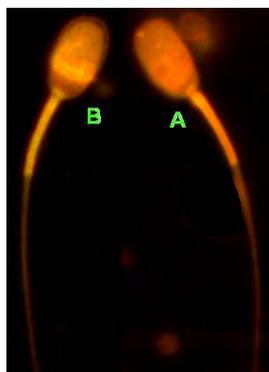


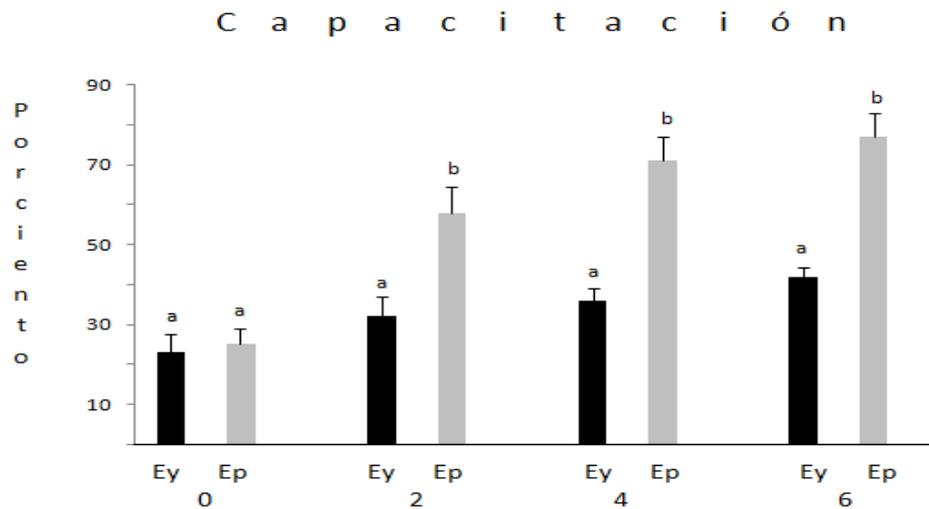
Figura 4. Tinción de espermatozoides de conejo con clorhidrato de tetraciclina. Esta foto muestra el patrón de fluorescencia de un espermatozoide sin capacitar (A), fluorescencia homogénea en todo el espermatozoide y otro capacitado (B) disminución de la fluorescencia en la región acrosomal y la presencia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

En el Cuadro 2 se presentan los resultados de los porcentajes de espermatozoides capacitados de muestras de eyaculado y de epidídimo de las 0 a las 6 horas. A las 0 horas no hay una diferencia significativa entre los espermatozoides que presentaron capacitación entre las muestras de eyaculado y epidídimo, sin embargo en los tiempos posteriores (2, 4 y 6 horas) si se observa una diferencia significativa entre ambos tipos de muestras.

Cuadro 2. Porcentajes de espermatozoides capacitados de muestras de eyaculado y de epidídimo de las 0 a las 6 horas.

	Eyaculado	Epidídimo
Capacitación 0 hrs	23 ± 4.7 *a	25 ± 4.1 *a
Capacitación 2 hrs	32 ± 5.1 *a	58 ± 6.5 *b
Capacitación 4 hrs	36 ± 3.2 *a	71 ± 5.9 *b
Capacitación 6 hrs	42 ± 2.4 *a	77 ± 6.1 *b

Los datos en el Cuadro, son el promedio y error estándar. Diferente letra indica diferencia estadística ($p < 0.05$), entre datos del mismo renglón. Prueba ANOVA y Tukey. $n=6$.



Gráfica 1. Porcentaje de espermatozoides capacitados de muestras de Eyaculado (Ey) y de Epidídimo (Ep) a las 0, 2, 4 y 6 horas (\pm error estándar). La capacitación fue diferente entre grupos con diferentes literales (a,b) ($P < 0.05$). $n=6$.

Reacción acrosomal

Para detectar el porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal se realizó una tinción con azul de Coomasie.

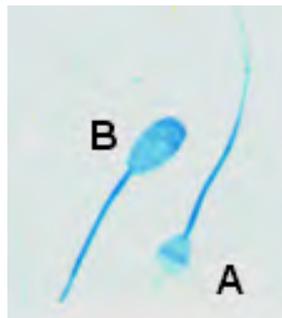


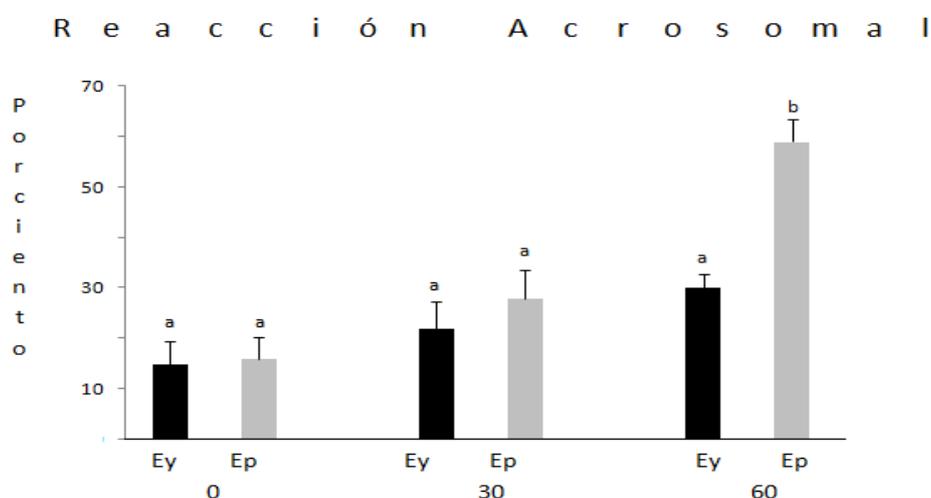
Figura 5. Tinción de espermatozoides con azul brillante de Coomassie, espermatozoides con reacción acrosomal, la falta de tinción azul en el dominio acrosomal es característico (A), (B) espermatozoides no reaccionados la tinción homogénea es indicativo de una membrana plasmática intacta.

En el Cuadro 3 se presentan los resultados de los porcentajes de espermatozoides con reacción acrosomal de muestras de eyaculado y de epidídimo de los 0, 30 y 60 minutos post-capacitación. A los 0 y 30 minutos no hay una diferencia significativa entre los espermatozoides que presentaron reacción acrosomal entre las muestras de eyaculado y epidídimo, sin embargo en ultimo tiempo (60 minutos) si se observa una diferencia significativa entre ambos tipos de muestras.

Cuadro 3. Porcentajes de espermatozoides con reacción acrosomal de muestras de eyaculado y de epidídimo de los 0 minutos a los 60 minutos post capacitación.

	Eyaculado	Epidídimo
Reacción acrosomal 0 min.	15 ± 4.4 *a	16 ± 4.2 *a
Reacción acrosomal 30 min.	22 ± 5.4 *a	28 ± 5.5 *a
Reacción acrosomal 60 min.	30 ± 2.8 *a	59 ± 4.4 *b

Los datos en el Cuadro, son el promedio y error estándar. Diferente letra indica diferencia estadística ($p < 0.05$), entre datos del mismo renglón. Prueba ANOVA y Tukey. $n=6$.



Gráfica 2. Porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal de muestras de Eyaculado (Ey) y de Epidídimo (Ep) a los 0, 30, 60 minutos (\pm error estándar). La reacción acrosomal fue diferente entre grupos con diferentes literales (a,b) ($P < 0.05$). $n=6$.

Ubiquitinación

Para detectar el porcentaje de espermatozoides ubiquitinados se realizó una tinción basada en la unión de un anticuerpo secundario marcado con isotiocianato de fluoresceína.

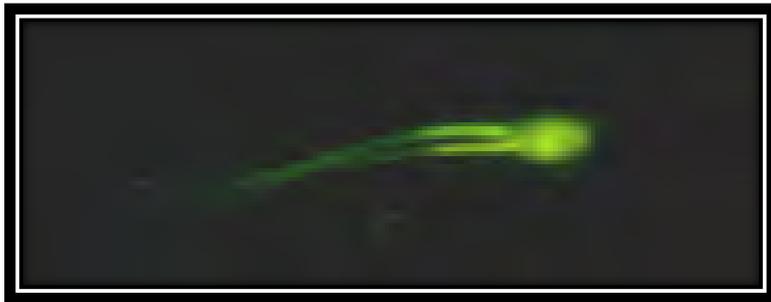


Figura 6. Fotografía de microscopía de fluorescencia mostrando un espermatozoide de conejo con dos colas ubiquitinado en la parte media del acrosoma en la porción anterior y también en la parte media del flagelo.

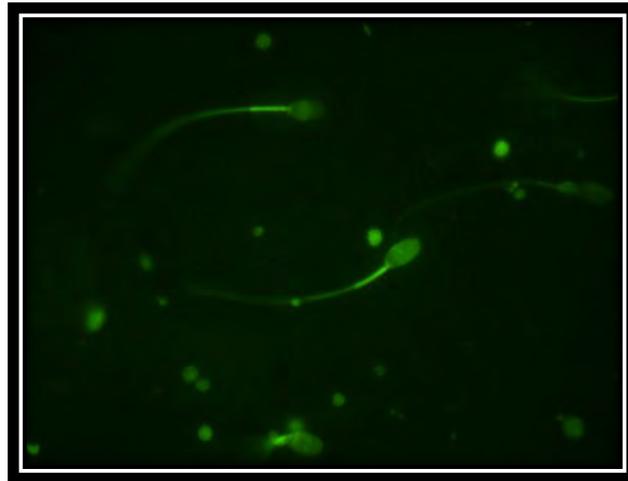


Figura 7. Fotografía de microscopía de fluorescencia mostrando al centro dos espermatozoides de conejo ubiquitinados principalmente en la parte media del flagelo.

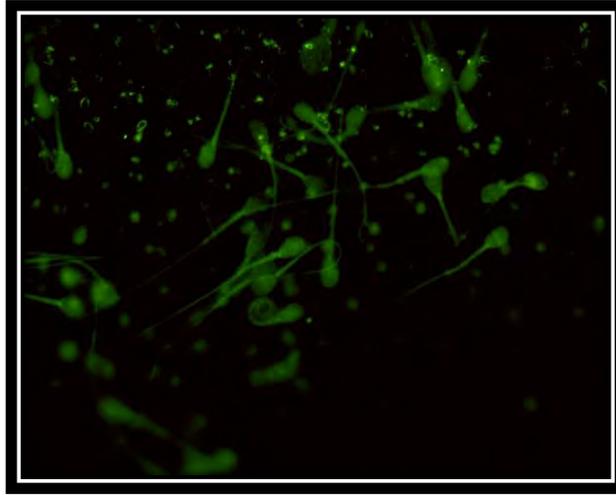


Figura 8. Fotografía de microscopia de fluorescencia mostrando espermatozoides de conejo ubiquitinados.

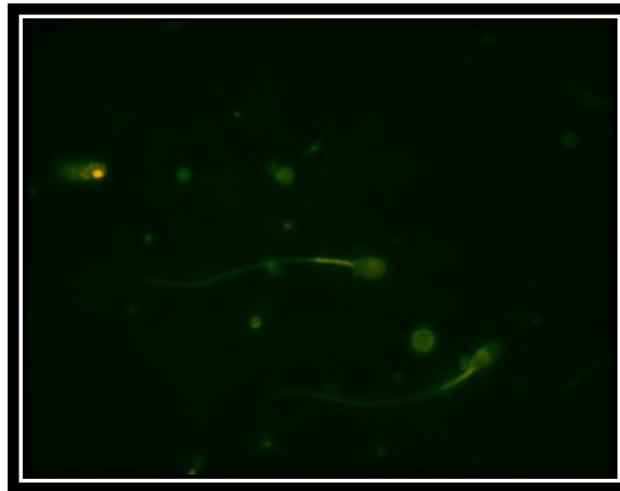


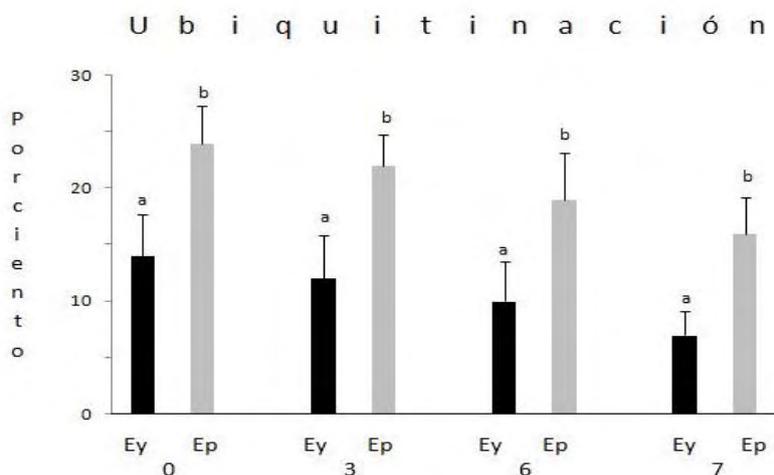
Figura 9. Fotografía de microscopia de fluorescencia mostrando espermatozoides de conejo ubiquitinados.

En el Cuadro 4 se presentan los resultados de los porcentajes de espermatozoides ubiquitinados de muestras de eyaculado y de epidídimo a las 0, 3 y 6 horas de capacitación y a las 7 horas (6 horas de capacitación + 1 hora de reacción acrosomal). En todos los tiempos se observa una diferencia significativa entre ambos tipos de muestras ($p < 0.05$).

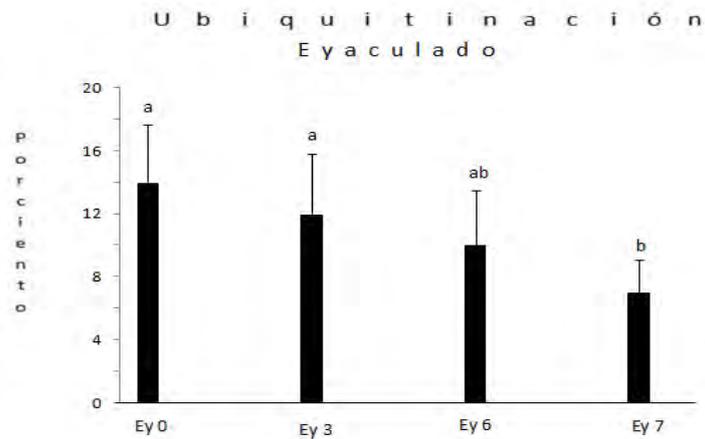
Cuadro 4. Porcentajes de espermatozoides de muestras de eyaculado y de epidídimo que presentaron ubiquitinación de las 0 a las 6 horas de capacitación y a las 7 horas durante la reacción acrosomal.

	Eyaculado	Epidídimo
Ubiquitinación 0 hrs	14 ± 3.7*a	24 ± 3.3 *b
Ubiquitinación 3 hrs	12 ± 3.8*a	22 ± 2.8 *b
Ubiquitinación 6 hrs	10 ± 3.5*a	19 ± 4.1 *b
Ubiquitinación 7 hrs	7 ± 2.1*a	16 ± 3.2 *b

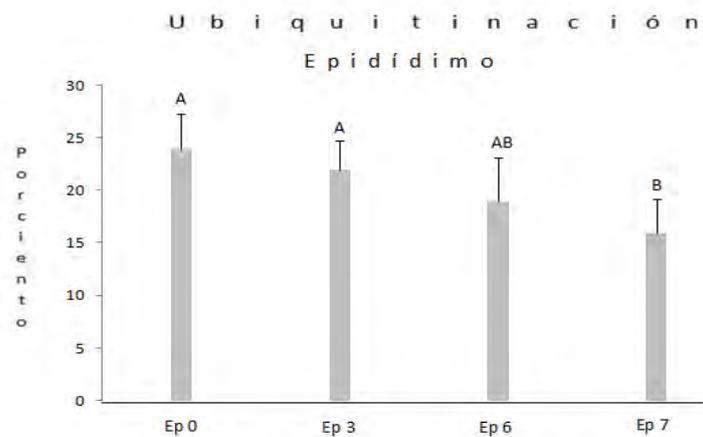
Los datos en el Cuadro, son el promedio y error estándar. Diferente letra indica diferencia estadística ($p < 0.05$), entre datos del mismo renglón. Prueba ANOVA y Tukey. $n = 6$.



Gráfica 3. Porcentaje de espermatozoides Ubiquitinados de muestras de Eyaculado (Ey) y de Epidídimo (Ep) a las 0, 3, 6 y 7 horas (\pm error estándar). La ubiquitinación fue diferente entre grupos con diferentes literales (a,b) ($P < 0.05$). $n = 6$.



Gráfica 4. Porcentaje de espermatozoides Ubiquitinados de muestras de Eyaculado (Ey) a las 0, 3, 6 y 7 horas (\pm error estándar). La ubiquitinación fue diferente entre grupos con diferentes literales (a,b) ($P < 0.05$). $n=6$.



Gráfica 5. Porcentaje de espermatozoides Ubiquitinados de muestras de Epidídimo (Ep) a las 0, 3, 6 y 7 horas (\pm error estándar). La ubiquitinación fue diferente entre grupos con diferentes literales (A, B) ($P < 0.05$). $n=6$.

Las siguientes figuras muestran los resultados obtenidos en el citómetro de flujo, se observa la disminución del porcentaje de espermatozoides ubiquitinados conforme transcurría el tiempo de capacitación y reacción acrosomal, tanto en muestras de eyaculado como en muestras de epidídimo.

Cuadro 5. Relación de tiempo con respecto al color para la comparación de resultados obtenidos en el citómetro de flujo.

Tiempo	Color
0 hr. Capacitación	Verde oscuro
2 hr. Capacitación	Negro
4 hr. Capacitación	Verde limón
6 hr. Capacitación	Azul marino
6 hr. + 30 min. Reacción acrosomal	Morado
6 hr. + 6 ^o min. Reacción acrosomal	Verde aqua

Figura 10. Resultados obtenidos en el citómetro de flujo en muestras de eyaculado.

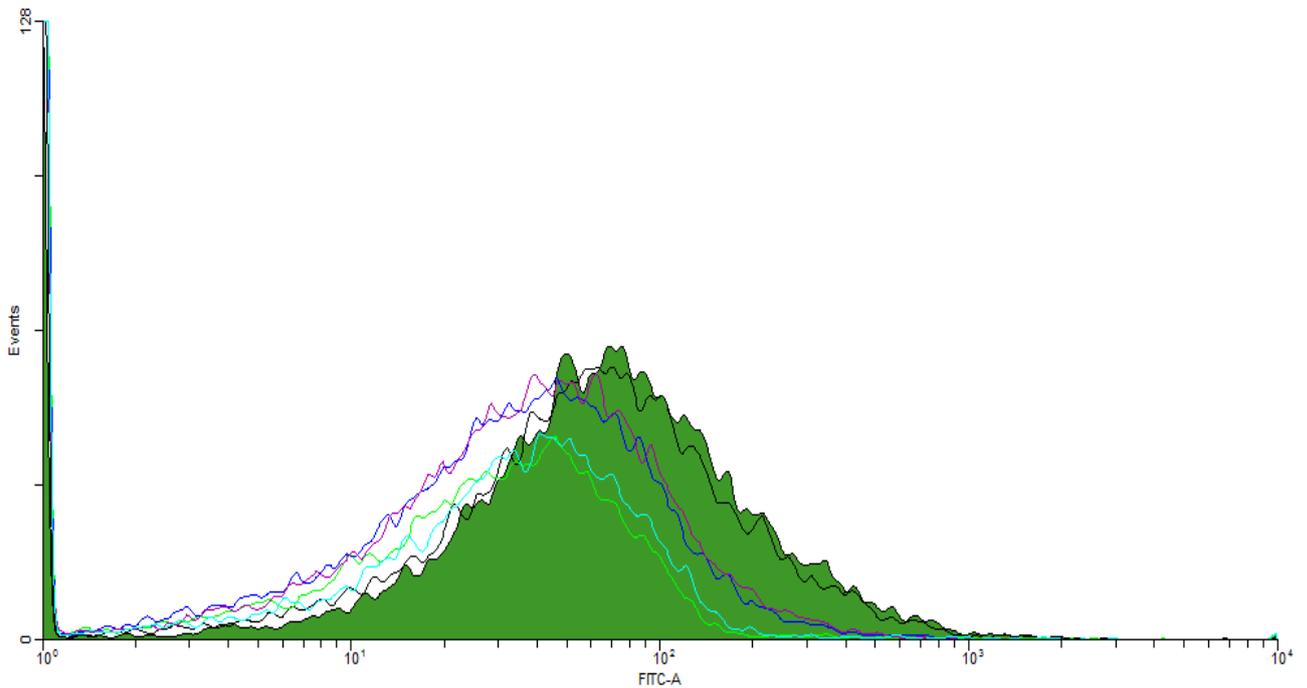
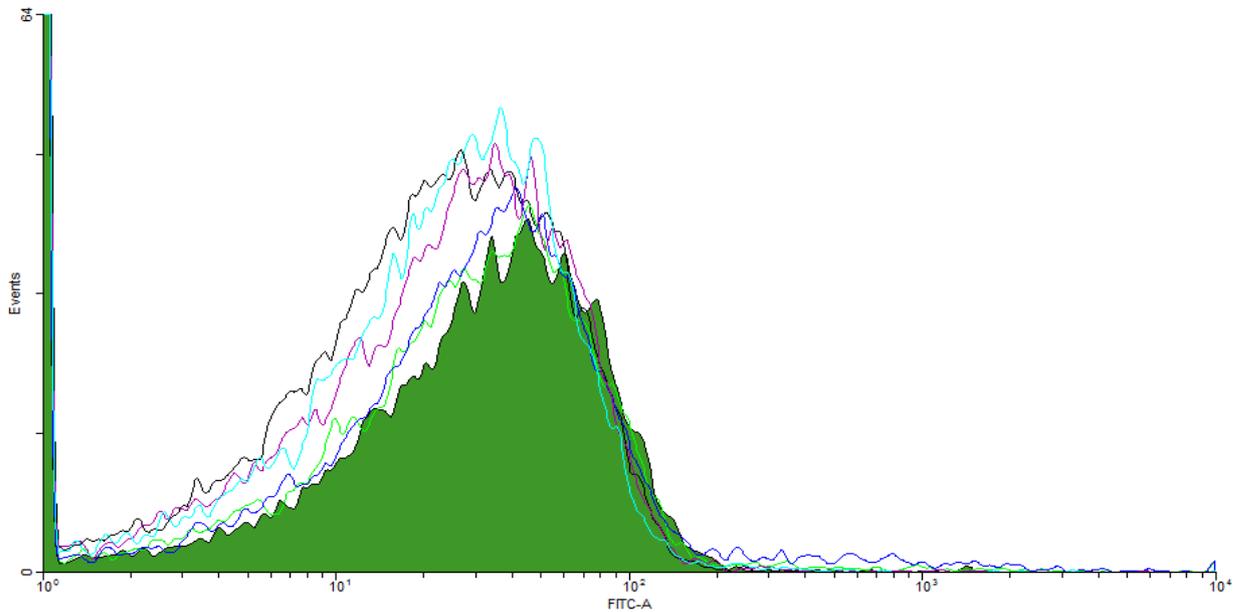


Figura 11. Resultados obtenidos en el citómetro de flujo en muestras de epidídimo.



Cuadro 5. Relación de tiempo con respecto al color para comparar los resultados obtenidos en el citómetro de flujo.

Tiempo	Color
0 hr. Capacitación	Verde oscuro
2 hr. Capacitación	Negro
4 hr. Capacitación	Verde limón
6 hr. Capacitación	Azul marino
6 hr. + 30 min. Reacción acrosomal	Morado
6 hr. + 6 ^o min. Reacción acrosomal	Verde aqua

DISCUSIÓN

El volumen de las muestras de eyaculado en promedio fue de 0.52 ± 0.10 ml, el volumen de muestra recuperado en muestras de epidídimo (1 ml) no tiene error estándar debido a que a todas las muestras se les realizó la perfusión con 1 ml del medio capacitante, sin embargo cabe mencionar que el volumen normal en un eyaculado es de 0.3-0.8 ml (Alvariño, 1993; Ambriz, 2003). El volumen medio y concentración espermática aumentan con la edad. Se ha demostrado al considerar machos de 5 meses o de más de 8 meses de edad, que el volumen pasa de 0.3 a 0.5 ml, y la concentración de 200 a 300 millones/ml (Alvariño, 1993; García et al, 2006; Ambriz, 2003). En ambos casos cabe señalar que los resultados obtenidos se encuentran dentro de los parámetros normales señalados en la bibliografía.

Las viabilidades obtenidas están dentro del rango normal en ambas muestras, $86 \pm 4.8\%$ en eyaculado y $80 \pm 3.2\%$ en epidídimo, pero cabe señalar que fueron eliminadas un 10% de las muestras que presentaron un valor menor al 75% de viabilidad.

La concentración promedio de los eyaculados ($206 \pm 66 \times 10^6$ /ml) estuvo dentro del rango normal en muestras de semen de conejo ya que según García (2006) estos se encuentran entre los 50 y 500 millones de espermatozoides por ml, si bien se encuentra normalmente entre 150 y 350 millones hay que tener en cuenta, que las características incluyendo la concentración espermática, varía según la raza, estación del año y la edad (Boyd, 1987).

Por otro lado las concentraciones obtenidas en muestras de epidídimos (193×10^6 /ml \pm 43) son variables debido a que la perfusión no se realizó exactamente en el mismo sitio del epidídimo. No obstante, las reservas de la cola del epidídimo pueden variar notablemente en función de la actividad sexual (Alvariño, 1993; Ambriz 2003).

Con respecto a la motilidad los resultados se encuentran en lo normal ($77.5 \pm 2.7\%$ en eyaculado y $74 \pm 6.6\%$ en epidídimo) debido a que sólo se utilizaron muestras con movimientos calificados entre buenos y excelentes, pero Alvariño (1993) menciona un 60% de motilidad espermática en el primer eyaculado del día. En esta investigación

obtuvimos un mayor porcentaje debido al descarte de muestras que presentaron baja motilidad.

La capacitación de las muestras se realizó con medio Brackett durante un periodo de 6 horas, se utilizó este medio ya que es un buen inductor de capacitación espermática, de acuerdo a lo mencionado por Brackett (1975), Reyes et al., (1978), Ávalos et. al., (2004) y Mayren (2007) y se realizó durante este periodo, ya que se afirma que el mayor porcentaje de espermatozoides capacitados, en el caso del conejo, se da a las 6 horas.

Durante el proceso de capacitación bajo condiciones *in vitro*, alguno de los componentes del medio capacitante puede estimular el movimiento transmembranal de los fosfolípidos y propiciar la pérdida de la asimetría membranal del espermatozoide, tales componentes del medio capacitante son el Ca^{2+} que juega un papel muy importante en la maduración epididimaria, en la regulación de la movilidad y sobre todo, en que el espermatozoide adquiere la capacidad fertilizante, facilitando la capacitación y la reacción acrosomal (Emiliozzi y Fenichel, 1997; Osheroff et al., 1999; Dacheux, 2003) el bicarbonato de sodio (Gadella y Harrison, 2000) e indirectamente la albúmina por su capacidad de producir la liberación del colesterol presente en la membrana plasmática del espermatozoide. Cabe destacar que el medio Brackett capacitante contiene tanto calcio, como bicarbonato de sodio y albúmina (Brackett, 1975).

Una vez madurados los espermatozoides, estos son eyaculados y depositados en el aparato reproductor femenino donde experimentarán el proceso de capacitación, el cual se caracteriza por una serie de cambios a nivel de la membrana plasmática como son: remoción gradual o alteración de glicoproteínas, disminución del contenido de colesterol y cambios en la distribución y composición de fosfolípidos de la membrana (Gadella et al., 2001, Daleke, 2003).

Para que un espermatozoide alcance la capacidad fertilizante requiere de procesos fisiológicos como la maduración epididimaria, la capacitación y la reacción acrosomal (Dacheux, 2003). Sólo los espermatozoides capacitados son capaces de entrar en contacto con la ZP, lo cual desencadena la fusión de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa, seguida de la formación de poros y vesículas, que

permiten la salida del contenido acrosomal y la penetración del espermatozoide en el ovocito, este evento fisiológico recibe el nombre de reacción acrosomal (Yanagimachi, 1994).

Se sabe que los espermatozoides obtenidos de la cola de epidídimo de especies como el ratón, rata, carnero y conejo, tienen capacidad fertilizante (Knobil et al., 1994), sin embargo, también es cierto que el proceso de eyaculación proporciona algunos cambios al espermatozoide que han sido detectados con el uso de lectinas. Los espermatozoides son cubiertos por proteínas del plasma seminal producidas por las glándulas accesorias. Existe la probabilidad de que las sustancias que proveen las glándulas accesorias a los espermatozoides de eyaculado, les da una mayor susceptibilidad para reaccionar más rápido al proceso de capacitación (Cadavid., 2005).

Al respecto Ávalos et al (2004) reporta que los espermatozoides de epidídimo respondieron más rápido a la inducción *in vitro* de la capacitación espermática en comparación con espermatozoides de eyaculado de igual manera nuestros resultados apoyan esta aseveración ya que existe una diferencia significativa entre las 2, 4 y 6 horas, en las cuales hay un mayor número de espermatozoides capacitados en muestras de epidídimo.

En otro estudio (Harkema et al., 2004), se encontró que un mayor porcentaje de espermatozoides obtenidos de cola de epidídimo llegó a la capacitación en 6 horas de incubación en condiciones capacitantes cuando se compararon con espermatozoides eyaculados incubados bajo las mismas condiciones. Estas diferencias confieren cierta ventaja, en cuanto al tiempo necesario para alcanzar la capacitación, a los espermatozoides de cola de epidídimo sobre los espermatozoides de eyaculado. Dicha ventaja prosigue durante la reacción acrosomal (García-Macedo et al., 2001).

Nuestros resultados refuerzan esta teoría ya que a las 6 horas de capacitación en muestras de eyaculado se observa un 42% en contra de un ventajoso 77% en epidídimo.

Cabe señalar que los espermatozoides que presenten capacitación más rápida tendrán también una reacción acrosomal más rápida, que si ocurre antes de llegar al ovocito eliminara cualquier probabilidad de que se puede unir con este debido a que ya produjo la liberación de las enzimas que necesita para penetrarlo (Ávalos, 2004).

Nuestros resultados mostraron que durante el periodo de capacitación de 6 hrs un porcentaje más alto de los espermatozoides de epidídimo se capacitaron en comparación con los espermatozoides eyaculados (77 ± 6.1 contra $42 \pm 2.4\%$ respectivamente). Estas diferencias entre epidídimo y eyaculado subsistieron durante el desarrollo de la reacción acrosomal (59 ± 4.4 contra $30 \pm 2.8\%$ respectivamente).

La P_4 es una hormona que se encuentra en forma natural en el aparato reproductor femenino (Meizel y Turner, 1991; Thérien y Manjunath, 2003) juega un papel importante en el proceso de fertilización, incluyendo la capacitación y la reacción acrosomal. Entre los efectos que produce se encuentra el aumento de las concentraciones sistólicas de Ca^{2+} , un incremento en la fosforilación de tirosina en las proteínas de los espermatozoides (Baldi et al., 1995) y la salida de Cl^{-1} (Meizel y Turner, 1996), lo que desencadena cambios membranales importantes. En diferentes especies animales se ha demostrado que la progesterona estimula la reacción acrosomal en espermatozoides capacitados (Kirkman- Brown et al., 2002).

Durante la capacitación, la eliminación de componentes superficiales deja al descubierto los receptores para P_4 en la membrana plasmática del espermatozoide (Cheng et al., 1998). Los espermatozoides que exponen receptores funcionales a P_4 inician la reacción acrosomal cuando son estimulados por esta, produciendo una rápida activación del flujo del calcio (Kirkman- Brown et al., 2002). La estimulación de la reacción acrosomal con progesterona, en espermatozoides capacitados ha sido demostrada en varias especies de animales (Kirkman-Brown et al., 2002). Nuestros resultados demuestran que en muestras espermáticas de eyaculado y de epidídimo de conejo la progesterona es capaz de producir reacción acrosomal.

Ávalos et al., (2004) y Mayren (2007), realizaron estudios similares en conejo, induciendo la reacción acrosomal con P_4 , obteniendo un incremento paulatino en el número de espermatozoides reaccionados conforme el tiempo transcurría. Tal como los

resultados de esta investigación, obteniendo un 15% de espermatozoides reaccionados al inicio de la reacción acrosomal, aumentando hasta un 30% a los 60 minutos en muestras de eyaculado después de haber iniciado el proceso, y teniendo un 16% de espermatozoides reaccionados al inicio de la reacción acrosomal aumentando hasta un 59% a los 60 minutos en muestras de epidídimo. En el caso de espermatozoides humanos Baldi (1998) también indujo de esta forma la capacitación teniendo resultados favorables y un aumento gradual conforme el transcurso del tiempo.

En otro estudio Ávalos et al., (2004) reportaron que durante la capacitación y la reacción acrosomal inducida con P₄, los espermatozoides de conejo pierden la asimetría fosfolipídica de la membrana plasmática. Esta pérdida en la asimetría puede ocurrir como consecuencia de la intervención de enzimas translocadoras de fosfolípidos y probablemente la pérdida de la asimetría fosfolipídica es un requisito para que se realice dicho evento.

Los espermatozoides obtenidos de la región caudal del epidídimo no tienen componentes adquiridos del plasma seminal, que pudieran alterar o retrasar su capacitación (Yanagimachi, 1994). Estudios recientes confieren ventaja a los espermatozoides de epidídimo sobre los eyaculados en términos del tiempo para alcanzar la reacción acrosomal (García-Macedo et al., 2001 y Harkema et al., 2004). De acuerdo a lo esperado, se obtuvo un mayor porcentaje de espermatozoides reaccionados conforme pasó el tiempo, 59% en las muestras de epidídimo a diferencia del 30% obtenido en las muestras de eyaculado.

Los espermatozoides no capacitados son incapaces de unirse a la zona pelúcida y mucho menos de penetrar la capa celular del *cumulus ooforus*; en contraste los espermatozoides capacitados pero sin reacción acrosomal, penetran la capa del *cumulus* pero no así al interior de la corona radiada. Existen evidencias de que la reacción acrosomal ocurre en la vecindad de la zona pelúcida y frecuentemente en el ámpula del oviducto en diversas especies de mamíferos (Ávalos et al., 2004; Frits et al., 2000).

O' Rand and Fisher, (1987) reportan una capacitación del 30% (con rangos del 15 - 46%) en 1hr 45min de inducción. El resultado obtenido más cercano para realizar una

comparación sería a las 2 horas, al obtenerse un $58 \pm 6.5\%$ de espermatozoides capacitados a las 2 horas en muestras de eyaculado y un $32 \pm 5.1\%$ de espermatozoides capacitados a las 2 horas en muestras de cola de epidídimo. Tales diferencias tal vez se deban al medio capacitante utilizado.

La inducción a la reacción acrosomal utilizada en esta investigación fue a lo largo de 1 hora obteniendo como resultado final $30 \pm 2.8 \%$ en eyaculado y $59 \pm 4.4 \%$ en epidídimo, lo que indicaría que se tuvo una reacción acrosomal más lenta en muestras de eyaculado, datos estadísticos similares a los obtenidos por Mayren (2007) en muestras de cola de epidídimo ya que el a la hora obtuvo $53.6 \pm 3.68\%$ de reaccionados.

En otros estudios se ha inducido la reacción acrosomal con diferentes medios como rojo fenol + suero de albúmina bovina (Kirkman- Brown et al., 2002), y albúmina sérica humana, Tris+NaCl, en los cuales se indujo la reacción acrosomal bajo las mismas condiciones de la presente investigación (1 hr., 37C y 5% CO₂) obteniendo buenos resultados en la reacción acrosomal.

El patrón de fluorescencia de los espermatozoides sin capacitar mostró fluorescencia homogénea en toda la estructura, los espermatozoides capacitados mostraron disminución de la fluorescencia en la región acrosomal y la presencia de una banda fluorescente brillante en la región ecuatorial de igual forma que lo obtenido por Mayren (2007). Lo que nos indica que éste sería el patrón básico de fluorescencia que presentan espermatozoides capacitados y no capacitados al realizar el mismo procedimiento de tinción, es necesario realizar más estudios al respecto para afirmar que ese sería el patrón general para distinguir entre espermatozoides capacitados y sin capacitar.

Para observar los espermatozoides con reacción acrosomal se realizaron tinciones con azul brillante de Coomassie, la falta de tinción azul en el dominio acrosomal es característica de espermatozoides con reacción acrosomal, mientras que en espermatozoides no reaccionados, la tinción homogénea indica una membrana plasmática intacta. Esto indica que este sería el patrón básico de fluorescencia que presentan espermatozoides reaccionados y no reaccionados al realizar el mismo

procedimiento de tinción, ya que los resultados obtenidos en ésta investigación en cuanto al patrón de tinción son similares a lo obtenido por Mayren (2007) después de inducir la reacción acrosomal con progesterona. Tomando en consideración estos resultados, se puede sugerir que para la valoración del estado del acrosoma la técnica de tinción de azul de Coomasie resulta recomendable.

La inducción *in vitro* de la capacitación y/o la reacción acrosomal con progesterona o con ionóforo A23187, produce importantes cambios diferenciales en los subdominios acrosomal y post-acrosomal en la asimetría de la membrana de la cabeza del espermatozoide (Ávalos et al, 2004).

La exocitosis que acompaña a la reacción acrosomal, es un proceso que al igual que en otras células no está entendido en su totalidad. Múltiples fusiones entre la membrana de las vesículas exocíticas (del acrosoma) y de la membrana plasmática permiten la liberación de enzimas hidrolíticas, principalmente acrosina (Spungin et al., 1996).

En cuanto a los resultados obtenidos de ubiquitinación no se puede hacer un análisis detallado debido a que principalmente los estudios llevados a cabo son en espermatozoides de humano.

Sin embargo resultados previos muestran que no hubo diferencia significativa entre porcentajes de espermatozoides positivos a ubiquitina en las diferentes regiones del aparato reproductor de la coneja y espermatozoides de eyaculado (Toledano, 2008).

En ésta investigación los resultados obtenidos muestran un patrón de fluorescencia semejantes a los resultados obtenidos por Toledano (2008). Si bien Toledano no observó diferencias entre el porcentaje de espermatozoides ubiquitinados obtenidos de eyaculado y los de las diferentes regiones del aparato reproductor femenino, si observó la presencia de un patrón de fluorescencia diferencial. Los espermatozoides obtenidos de eyaculado y de vagina presentaron más de un 80% ubiquitinación de la pieza media del flagelo en dicha investigación.

Lo anterior coincide con Sutovsky et al (2002) donde muestran que los espermatozoides de eyaculado que presentan 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 ubiquitina, principalmente en la pieza media por 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.

De acuerdo con los estudios realizados por Toledano (2007), quien encontró que los espermatozoides obtenidos de útero y 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.

Los resultados obtenidos en esta investigación muestran una diferencia en los porcentajes de espermatozoides ubiquitinados entre muestras obtenidas de eyaculado y muestras obtenidas de epidídimo.

Los porcentajes de espermatozoides ubiquitinados se contabilizaron mediante la observación de frotis en un microscopio de fluorescencia. Cabe señalar las desventajas de estos, ya que dan una interpretación subjetiva, baja sensibilidad y no es posible la automatización; aunque se tiene la ventaja de poder discriminar entre diversos patrones de fluorescencia, siendo un buen método de escrutinio.

También se realizó un análisis mediante citometría de flujo para obtener la cantidad de espermatozoides reaccionados y ubiquitinados, mostrando ser un método sensible para dicha detección. Esta respuesta era de esperarse dado que a través de este método se pueden detectar cambios muy sutiles como la presencia de fosfatidilserina en la cara externa de las vesículas formadas durante la reacción acrosomal (Ávalos et al, 2004).

Ávalos y colaboradores (2004) mencionan que cuando se compararon los datos de citometría de flujo en los que se tomo la capacitación y la reacción acrosomal en

función del porcentaje de espermatozoides que emitieron fluorescencia positiva con los porcentajes de espermatozoides reaccionados según la tinción con azul de Coomasie, se pudo comprobar que en todos los casos los datos de tinción mostraron siempre las mismas tendencias que los datos por citometría.

CONCLUSIÓN

En el presente trabajo se demostró que se produce el proceso de ubiquitinación de las proteínas de la membrana plasmática del espermatozoide de conejo al inducir *in vitro* la capacitación y la reacción acrosomal, y que existe una diferencia significativa entre ambos tipos de muestras en todos los tiempos, siendo un porcentaje más alto de espermatozoides ubiquitinados en el epidídimo.

Los espermatozoides de epidídimo al presentar una rápida capacitación y por lo tanto una rápida reacción acrosomal liberan las enzimas necesarias para penetrar al ovocito, disminuyendo así la probabilidad de fecundar, así el proceso de ubiquitinación podría participar en la selección y eliminación de espermatozoides de conejo no aptos para la fecundación.

LITERATURA CITADA

- Agell N, Mezquita C. Cellular content of ubiquitin and formation of ubiquitina conjugates during chicken spermatogénesis. *Biochem. J* 1988; 250:883-889.
- Alberts B, Jonshson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Water P. *The Molecular Biology of the Cell*. 2002 4th Edition, Gerland Science.
- Alvariño M. R. Control de la reproducción en el conejo. *Mundi-Prensa* 1993, 25-77.
- Ambriz D, Contreras JL, Hernández O, Mercado E, Cervantes FA, Rosado A. Estudio comparativo de los testículos, epidídimos, glándulas sexuales accesorias y espermatozoides en tres especies de lagomorfos (*Romerolagus diazi*, *Lepus californicus* y *Oryctolagus cuniculus*). *Acta Zool. Mex.* 2003, 88:257-269.
- Ávalos R, Ortiz M, Ortega C, Vergara O, Rosado G, y Rosales T. Fluorometric Study of Rabbit Sperm Head Membrana Phospholipid Asymmetry During Capacitation And Acrosome Reaction Using Annexin-V Fit. *Archives of Andrology* 2004,50: 273-285.
- Baarends WM, Hoogerbrugge JW, Roest HP, Ooms M, Vreeburg J, Hoeijmakers J, Grootegoed JA. Histone ubiquitination and chromatin remodeling in mouse spermatogenesis. *Dev. Biol.* 1999-a, 207: 322–333.
- Baarends WM, Roest HP, Grootegoed AP. The ubiquitin system in gametogénesis. *Mol. Cell. Endo* 1999-b, 151:5-16.
- Baccetti B, Collodel G, Piomboni P. Apoptosis in human ejaculated sperm cell notulae seminologicae. *J. Submicros. Cytol. Pathol.* 1996, 28:587- 596.
- Barros C, Crosby JA, Moreno RD. Early steps of sperm - egg interactions during mammalian fertilization. *Cell Biol Int* 1996, 144: 33-9.
- Barroso VG, Karchmer KS, Castelazo ME, Carballo ME, Kably AA. Changes in mitochondrial membrane potentials and its exponential relation with phosphatidylserine translocation in the plasma membrane as markers in the initial events of apoptosis: evaluation in different spermatic fractions. *Ginecol Obstet Mex.* 2002, 270:182-9.
- Branham MT, Mayorga LS, Tomes CN. Calcium-induced acrosomal exocytosis requires cAMP acting through a protein kinase A-independent, Epac-mediated pathway. *J Biol Chem.* 2006, 281(13):8656-66.
- Baumeister W, Walz J, Zühl F, Seemüller E. The proteasome paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell.* 1998, 92:367-380.
- Bebington C, Bell Sc, Doherty A. Localisation of ubiquitina and ubiquitina cros-reactive protein in human and baboon endometrium and deciduas during the menstrual cycle and early pregnancy. *Biol. Reprod.* 1999, 60:920-928.
- Bebington C, Doherty FJ, Fleming SD. The possible biological and reproductive functions of ubiquitin. *Hum. Reprod. Update* 2001, 7:102–111.
- Bebington C, Doherty FJ, Ndukwe G. The progesterone receptor and ubiquitina are differentially regulated within the endometrial glands of the natural and stimulated cycle. *Mol. Hum. Reprod.* 2000, 6: 264-268.

- Belote JM, Miller M, Smyth KA. Evolutionary conservation of a testes-specific proteasome subunit gene in drosophila. *Gene* 1998, 215:93-100.
- Belsey MA Moghissi KS, Aliason RJ, Paulsen CA, Gallegos A y Prasad MRN (1980). Laboratory manual for the examination of human semen, cervical mucus interaction published by Press Concerní Singapore 1980.
- Boyd IL. Myhill DG. Seasonal changes in condition and fecundity in the wild European rabbit *Oryctolagus cuniculus*. *J. Zool.* 1987, 212:223-233.
- Brackett BG. y Oliphant G. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biology of Reproduction* 1975; 12, 260-245.
- Cadavid A.P. and Cardona M. Evaluación de la reacción acrosomal en espermatozoides humanos inducida por los monosacáridos manosa y N- acetilglucosamina. *Actas urológicas españolas* 2005, 29: 676-684.
- Cánovas S, Coy P. Molecular feactures of fertilization: gamete binding and fusion. *Rev Invest Clin.* 2008, 60(5):403-13.
- Cascales M. Vía de la ubiquitina-proteosoma. *Anal. Real Acad. Nac. Farm.* 2005, 71: 45-82.
- Chen F, Chang D, Goh M, Klibanov SA, Ljungman M. Role of p53 in cell cycle regulation and apoptosis following exposute to proteasome inhibitors. *Cell. Growth Differ* 2000, 11:239-246.
- Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* 1994, 79:13-21.
- Ciechanover A, Finley D, Varshavsky A. Ubiquitin dependence of selective protein degradation demonstrated in the mammalian cell cycle mutants. *Cell* 1984, 37:57-66.
- Cross NL. Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol Reprod* 1998, 59:7-11.
- Cheng HP, Gadella BM, Voorhout WF, Fazeli A; Bevers MM, Colenbrander. Progesterone-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa is mediated by a plasma membrane progesterone receptor. *Biol Reprod* 1998, 59:733-42.
- Dacheux JL, Gatti JL., Dacheux F. Contribution of Epididymal Secretory Proteins for Spermatozoa Maturation. *Microsc. Res. Tech.* 2003, 6:7-17.
- Daleke DL. Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipids asymmetry. *J. Lipid Res.* 2000, 44: 233-242.
- Díaz PMA, Zarate MG, Carballo EM, Barrón AG, Villegas H., Alvarado AD. Efecto protector de la albúmina sobre las membranas del espermatozoide humano en la capacitación *in vitro*. *Peritanol. Reprod. Hum.* 1994; 8:77-82.
- Donnelly ET., Lewis SE, McNally JA. *In vitro* fertilization and pregnancy rates: the influence of sperm motility and morphology on IVF out come. *Fertil Steril.* 1998; 70, 305-314.
- Donnelly T.M. Rabbit basic anatomy and husbandry Elsevier Sci. 2004, 36-146.
- Dubé C, Leclerc P, Baba T, Reyes MC, Bailey JL. The proacrosin binding protein, sp32, is tyrosine phosphorylated during capacitation of pig sperm. *J Androl.* 2005, 26(4):519-28.

- Emiliozzi C and Fenichel P. Protein tyrosine phosphorylation is associated with capacitation of human sperm *in vitro* but is not sufficient for its completion. *Biol. Reprod.* 1997, 56: 674-679.
- Engel S, Schreiner, Petzoldt R. Lipid peroxidation in human spermatozoa and maintenance of progressive sperm motility. *Andrología* 1999; 31:17-22.
- Espinoza JA, Schulz MA, Sánchez R, Villegas JV. Integrity of mitochondrial membrane potential reflects human sperm quality. *Andrología* 2009,41(1):51-4.
- Fraile BR, Martin MP, Arenas FR, Bethencourt FP, Paniagua L. Light and electron microscopic immunohistochemical. 1996.
- Frits M, Flesch A, and Barend MG. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta* 2000, 1469, 197-235.
- Gadella BM, Nievelstein PFEM, Colembrander B and Van Kooij R. *Human Reprod* 1996. 11: 43.
- García MR. Efecto de los inhibidores de H⁺ ATPasas durante la maduración, capacitación y reacción acrosomal del espermatozoide de conejo. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana – Xochimilco. México, D.F. 2000.
- García TM, Sánchez J, Rafel O, Ramon J, Piles M. Variability, repeatability and phenotypic relationships of several characteristics of production and semen quality in rabbit. *Anim Reprod Sci.* 2006, (1-2):88-100.
- Gadella BM. and Harrison RA. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent. *Biol.Reprod.* 2000, 67: 340-350.
- Gook DA, Edgar DH, Borg J, Martic M. Detection of zona pellucida proteins during human folliculogenesis. *Hum Reprod.* 2008, (2):394-402.
- Green CM, Cokle SM. Fertilization promoting peptide, a tripeptide similar to ability of human spermatozoa *in vitro*. *Hum reprod.* 1996, 11 (4): 830-6.
- Grootegoed JA, Baarends WM, Roest HP. Knockout mouse model and gametogenic failure. *Mol, Cell. Endocrinol.* 1998, 145:161-166.
- Gupta V, Bhasin S, Guo W, Singh R, Miki R, Chauhan P, Choong K, Tchkonja T, Lebrasseur NK, Flanagan JN, Hamilton JA, Viereck JC, Narula NS, Kirkland JL, Jasuja R. Effects of dihydrotestosterone on differentiation and proliferation of human mesenchymal stem cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2008, 296(1-2):32-40.
- Green CM, Cokle SM. Fertilization promoting peptide, a tripeptide similar to ability of human spermatozoa *in vitro*. *Hum reprod.* 1999; 11 (4): 830-6.
- Guraya SS. Cellular and molecular biology of capacitation and acrosome reaction in spermatozoa. *Int Rev Cytol.* 2000, 199:1-64.
- Harkeman W, Harrison RAP, Miller NGA, Topper, EK and Woelders H. Enhanced binding of zona pellucida proteins to the acrosomal region of intact spermatozoa in response to fertilizing conditions: a flow cytometric study. *Biol reprod* 1998; 58: 421-430.
- Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu. Rev Biochem;* 1998; 67, 425-479.

- Hermo L, J Dworkin, and R. Oko. Role of epithelial clear cells of the rat epididymis in the disposal of the contents of cytoplasmic droplets detached from spermatozoa: *Am J Anat.*, 1998; 183 107–124.
- Hinsch KD, Hinsch E. The zona pellucida receptors ZP1, ZP2 and ZP3. *Andrología* 1999; 31: 305-28.
- Hodjat M, Akhondi MA, Al-Hasani S, Mobaraki M, Sadeghi MR. Increased sperm ubiquitination correlates with abnormal chromatin integrity. *Reprod Biomed* 2008 (3):324-30
- Jesenberg V, Jentsch Stefan. *Deadly encounter: Ubiquitin meets apoptosis*. Macmillan Magazines Ltd; 2002, 3:112-122.
- Johansson M, Adolfsson A, Berg M, Francis J, Hogstrom L, Janson PO, Sogn J, Hellstrom AL. Quality of life for couples 4-5.5 years after unsuccessful IVF treatment. *Acta Obstet Gynecol.* 2009, 26:1-10.
- Juárez ML. Caracterización de una nueva subestructura de la teca perinuclear del espermatozoide maduro no capacitado del cobayo. Tesis de nivel Doctorado. CINVESTAV, I.P.N., México 2000.
- Karpenko NO, Bondarenko VA, Kavok NS, Borikov Olu. The maturation of the spermatozoa: events, consequences and possible ways of control. *Fisiol Zh.* 2007, 53(1):91-103.
- Kasimanickam R, Kasimanickam V, Thatcher CD, Nebel RL, Cassell BG. (2007). Relationships among lipid peroxidation, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, sperm parameters, and competitive index in dairy bulls. *Theriogenology* 2007, 1567(5):1004-12.
- Kodama H, Kuribayashy Y. Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization. *J Androl* 1996; 17 (2): 151-7.
- Kirkman JC, Punt EL, Barratt CL and Publicover SJ. Zona pellucida and progesterone-induced Ca²⁺ signaling and acrosome reaction in human spermatozoa. *J Androl* 2002; 23: 306-315.
- Kinukawa M, Nagata M, Aoki F. Changes in flagellar bending during the course of hyperactivation in hamster spermatozoa. *Reproduction.* 2003 125(1):43-51.
- Knobil E. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven 1992, 189-315.
- Kuypers FA. Red cell membrane lipids in hemoglobinopathies. *Curr Mol Med.* 2008, 8(7):633-8.
- Baldi E, Krausz C, Luconi M, Bonaccorsi L, Maggi M and Forti G. Actions of progesterone on human sperm: a model of non-genomic effects of steroids. *J. Steroid Biochem Mol. Biol.* 1995; 53:199-203.
- Marin CJ, Vázquez MH, González F, Bloquier JA, Tezon JG, Miranda PV. Strontion supports human sperm capacitation but not follicular fluid-induced acrosome reaction. *Biol Reprod* 1999; 61:673-80.
- Marín CI, Veiga MF, Matos ML, Echeverría MF, Furlong LI, Vazquez MH. Expression of epithelial cadherin in the human male reproductive tract and gametes and evidence of its participation in fertilization. *Mol Hum Reprod.* 2008, 14(10):561-71.
- Masson D, Drouineaud V, Moiroux P, Gautier T, Dautin G, Schneider M, Fruchart-Najib J, Jauhainen M, Ehnholm C, Sagot P, Gambert P, Jimenez C, Lagrost L. Human seminal plasma

displays significant phospholipid transfer activity due to the presence of active phospholipid transfer protein. *Mol Hum Reprod*. 2003, 9(8):457-64.

Manjunath P, Thérien I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J Reprod. Immunol*. 2002, 53(1-2):109-19.

Mayren M.F.J. Participación de enzimas traslocasas durante la Reacción Acrosomal del espermatozoide de conejo. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. 2007 pp. 80.

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

Miller DJ. Sperm require β -N-acetyl-glucosaminidase to penetrate through the egg zona pellucida. *Development* 1993, 118:1279-1289.

Moore KL. *Embriología Clínica*. 3a. ed. México: Editorial Nueva Interamericana; 1985.

Mortimer ST, Swan M.A. Effect of image sampling frequency on established and smoothing-independent kinematic values of capacitation human spermatozoa. *Hum Reprod* 1999; 14: 997-4.

Mostafa T, Labib I, El-Khayat Y, El-Rahman El-Shahat A, Gadallah A. (2008). Human testicular arterial supply: gross anatomy, corrosion cast, and radiologic study. *Fertil Steril*. 90(6):2226-30.

Naz RK, Motre C et al. Hexokinasa present in human sperm is not tyrosine phosphorylated but its antibodies effect fertilizing capacity. *J Androl* 1996; 17(2); 143-40.

Orozco Benítez MG, Lemus Flores C, Hernández Ballesteros JA, Navarrete Méndez R, Juárez-Mosqueda Mde L. (2008). Alterations of domains in the plasmatic membrane due to damages of the perinuclear theca of pig preserved spermatozoa. *Pak J Biol Sci* 11(10):1360-4.

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

Ozanon C., Chouteau J., Sutovsky P. Adaptation of the sperm ubiquitin tag immunoassay (SUTI): relationship of sperm ubiquitylation with sperm quality in gradient-purified semen samples from 93 men from a general infertility clinic population. *Human Reproduction* 2005, 20 (8): 2271-2278.

Pellicer A. *Inseminación Artificial*. Vol. 1. Número 1. Madrid, España: Editorial Panamericana; 1995.

Picherit C, Bréchar S, Boucher D, Grizard G. Correlation between tyrosine phosphorylation intensity of a 107 kDa protein band and A23187-induced acrosome reaction in human spermatozoa. *Andrologia*. 2004, 36(6):370-7.

Pickart C. M. Polyubiquitin chains. In: Peters J. M., Harris J. R., Finley D., editors. *Ubiquitin and the biology of the cell*. New York: Plenum Press 1998, 19–63.

Ramírez Vega F. D. Efecto crioprotector de un medio de congelación a base de trehalosa sobre la viabilidad e integridad estructural de los espermatozoides de caballo y compararlo contra los diluyentes comerciales. Tesis Maestría. FMVZ. UNAM. 2008.

Reyes A, Goicoechea B y Rosado A. Calcium requirement for rabbit spermatozoa capacitation. *Fertility and Sterility* 1978, 29:451-455.

Skiba LM, Auger J et al. Stimulation of movement and acrosome reaction of human spermatozoa by PC12 liposomes encapsulating ATP. *Int J Androl* 1995; 18(6): 287-94.

Selvaraju S, Reddy IJ, Nandi S, Rao SB, Ravindra JP. Influence of IGF-I on buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa motility, membrane integrity, lipid peroxidation and fructose uptake *in vitro*. *Anim Reprod Sci.* 2008 Aug 12.

Sixt SU, Dahlmann B. Extracellular, circulating proteasomes and ubiquitin - incidence and relevance. *Biochim Biophys Acta.* 2008, 12:817-23.

Rajapurohitam V, Morales CR, Afly M, Lefrancois S, Bedard N, Wing SS. Activation of a UBC4-dependent pathway of ubiquitin conjugation during postnatal development of the rat testis. *Dev Biol.* 1999, 212:217-228.

Roblerol, Guadarama A et al. Effect of copper ion on the motility, viability, acrosome reaction and fertilizing capacity of human spermatozoa *in vitro*. *Reprod Fertil Dev*, 1996; 147: 871-74.

Rosales Torres, Guzmán Sánchez. Apoptosis. Revisión. *Técnica Pecuaria de México.* Abril-Junio año 46 vol 002. INIFAP. Méx. Pp 159-182. 2008.

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

Selvaraju S, Reddy IJ, Nandi S, Rao SB, Ravindra JP. Influence of IGF-I on buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa motility, membrane integrity, lipid peroxidation and fructose uptake *in vitro*. *Anim Reprod Sci.* 2008 Aug 12.

Sixt SU, Dahlmann B. Extracellular, circulating proteasomes and ubiquitin - incidence and relevance. *Biochim Biophys Acta.* 2008, 12:817-23.

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

Strous GJ, Govers R. The ubiquitin-proteasome system and endocytosis. *J. Cell. Sci.* 1999, 112:1417-1423.

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

Sutovsky P. Ubiquitin-dependent proteolysis in mammalian spermatogenesis, fertilization, and sperm quality control: Killing three birds with one stone. *Microsc. Res. Tech.* 2003, 61:88–102.

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

Sutovsky P, Moreno DR, Ramalho SJ, Dominko T, Simerly C, Schatten G. Ubiquitinated Sperm Mitochondria, Selective Proteolysis, and the Regulation of Mitochondrial Inheritance in Mammalian Embryos. *Biol. Reprod.* 2002, 63:582-590.

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

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

Sutovsky P, Terana Y, Schatten G. Ubiquitin-based sperm assay for the diagnosis of male factor infertility. *Hum. Reprod.* 2001 b, 16:250-258.

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

Tannert A, Töpfer PE, Herrmann A, Müller K, Müller P. The lipid composition modulates the influence of the bovine seminal plasma protein PDC-109 on membrane stability. *Biochemistry.* 2007, 46:11621-9.

Therein J, Moreau R, Manjunath P. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. *Biol Reprod* 1998; 59:1768-76.

Tipler C. P., Hutchon S. P., Hendil K., Tanaka K., Fishel S., Mater R. J. Purification and characterization of 26s proteosomes from human and mouse spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.* 1997, 3:1053-1060.

Toledano OA. La ubiquitinación de los espermatozoides durante su paso por el aparato reproductor de la coneja. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. D.F. 2008.

Toshimori K. Sperm plasma membrane modifications associated with fertilization in mammals. *J. Reprod. Dev.* 2000, 46:65-78.

Toshimori K. Biology of spermatozoa maturation: An overview with an introduction to this issue. *Microsc. Res. Tech.* 2003, 61:1-6.

Van der Schans GP, Haring R, van Dijk-Knijnenburg HC. An immunochemical assay to detect DNA damage in bovine sperm. *J. Androl.* 2000, 21:250-257.

Vázquez E. La ubiquitina marca a las proteínas seleccionadas para su degradación. *Bioquímica y biología molecular en línea.* [citado 26 Noviembre 2006. Disponible en la World Wide Web: <http://laguna.fmedic.unam.mx.html> 2003.

Visconti PE, Satewart SJ, Bblasco A, Battaglia L, Miranda P, Kopf GS, Tezon JG. Roles of bicarbonater, cAMP and protein tyrosine phosphorylation on capacitation and the spontaneous acrosome reaction of Hamster sperm. *Biol Reprod*, 1999; 61:76-4.

Weinman de, Williams W.L. Mechanism of capacitation of rabbit spermatozoa. *Nature.* 1964, 203:423-4.

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

Yin Y, Stahl BC, DeWolf WC, Morgentaler A. P53 mediated germ cell quality control in spermatogenesis. *Dev. Biol.* 1998, 204:165-171.

Zabludovsky N, Eltes F, Har-Even D, Geva E, Berkovitz E, Amit A, Barak Y, Bartoov B. Relationship between human sperm lipid peroxidation, comprehensive quality parameters and IVF outcome. *Andrología* 1999; 31: 91-8.

Zarate A. *Esterilidad e Infertilidad*. México: La Prensa Médica Mexicana; 1996.

Zhongguo XF, Chang JW. Influence of burying testis in inguinal region on spermatogenesis in rabbit to repair serotum defect. *Biol. Reprod.* 2008, 22(7): 842-4.