

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA - IZTAPALAPA

✓ DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD

EVALUACION BIOQUIMICA DE LA PRESENCIA Y PARTICIPACION  
DE ACTINA Y TUBULINA EN LA REACCION ACROSOMAL DE LOS  
ESPERMATOZOIDES DE COBAYO.

**D. A. IZTAPALAPA**

TESIS QUE PRESENTA LA Q.F.B.

✓ MARIA EUGENIA CHAVARRIA OLARTE

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL

GRADO DE ✓ MAESTRO EN BIOLOGIA

DE LA REPRODUCCION ANIMAL .

JULIO DE 1984 .

090355

ESTA TESIS SE REALIZO EN LA  
SECCION DE BIOQUIMICA DE LA  
REPRODUCCION, DIVISION DE  
BIOQUIMICA, DE LA UNIDAD DE  
INVESTIGACION BIOMEDICA DEL  
CENTRO MEDICO NACIONAL, IMSS,  
BAJO LA DIRECCION DEL DR.  
ALEJANDRO REYES FUENTES

CON TODO CARIÑO

A MIS PADRES

A MARCELA

CECILIA

VICENTE

JORGE MANUEL

MARY CECI

AL DR. ALEJANDRO REYES POR SU VALIOSA ASESORIA

AGRADEZCO A LAS AUTORIDADES Y  
AL PERSONAL DE LA DIVISION DE  
BIOQUIMICA DE LA U.I.B., C.M.N.,  
MUY ESPECIALMENTE A MIS COMPAÑE-  
ROS DE LA SECCION DE BIOQUIMICA  
DE LA REPRODUCCION LAS FACILIDA-  
DES Y AYUDA PRESTADA PARA LA  
REALIZACION DE ESTE TRABAJO.

C O N T E N I D O :

CAPITULO	I.-	Introducción
CAPITULO	II.-	Proteínas Contráctiles
CAPITULO	III.-	Material y Métodos
CAPITULO	IV.-	Resultados
CAPITULO	V.-	Discusión
CAPITULO	VI.-	Conclusiones
CAPITULO	VII.-	Bibliografía

C A P I T U L O   I

## INTRODUCCION.

A partir del momento en que el hombre empezó a estudiar y a conocer la fisiología de su organismo ha tratado de regularla y, en el caso de su reproducción, ha buscado algún método mágico, mecánico o terapéutico que impida la concepción o limite el tamaño de la progenie. Se han utilizado una gran variedad de métodos anticonceptivos como por ejemplo jaleas y espumas vaginales, diaframas, preservativos, coitus interruptus o bien abstinencia periódica; sin embargo, todas estas modalidades han dejado mucho que desear sobre todo desde el punto de vista de la aceptabilidad individual y la seguridad.

El advenimiento del control hormonal de la ovulación en los años 50, produjo un incremento significativo en la seguridad de la anticoncepción, lo mismo que el desarrollo y re-evaluación del uso de los dispositivos intrauterinos a partir de la década de los 60. Sin embargo, actualmente se ha incrementado también el conocimiento de los riesgos y efectos adversos de este tipo de medidas anticonceptivas, lo que ha señalado la necesidad de implementar programas de investigación que mejoren los métodos existentes de regular la fertilidad y que diseñen alternativas a los mismos.

Durante la última década se ha tratado de implementar metodología para regular la fertilidad a nivel de la trompa de fallopio, principalmente interfiriendo con la fertilización y/o con el transporte del ovocito antes o des

pués de la fertilización mediante el uso de hormonas esteroides, prostaglandinas o fármacos oxitócicos ( 1 ); sin embargo, la escasa perspectiva actual de implementar un método eficiente de regular la fertilidad en esta entidad del aparato reproductor femenino, se debe a la insuficiente infraestructura de conocimientos básicos indispensable para establecer una correlación estricta entre la anatomía, fisiología de la trompa de falopio y los aspectos bioquímicos y endocrinológicos que participan en los eventos de la reproducción.

La reacción acrosomal en los espermatozoides de mamífero es un proceso que se lleva a cabo en la región ampular de la trompa de falopio, en las inmediaciones del ovocito, y es un prerrequisito esencial para que suceda una fertilización ( 2 ), por lo que el conocimiento de los mecanismos moleculares que inician y regulan este fenómeno permitirá posiblemente desarrollar compuestos o dispositivos más seguros y efectivos, que interfieran con alguno de los diferentes pasos que se suceden en la reacción acrosomal y por lo tanto impidan la fertilización.

## CAPACITACION.

Desde hace más de 30 años se sabe que los espermatozoides eyaculados de mamífero necesitan permanecer en el tracto genital femenino durante cierto tiempo para adquirir la capacidad de fertilizar al óvulo ( 3 ). Durante su transporte en el útero y la trompa de fallopio, estas células experimentan una serie de cambios bioquímicos, ultraestructurales y funcionales que integran el proceso de capacitación ( 4 ); evento necesario en todas las especies de mamífero estudiadas hasta ahora, por lo que puede asumirse que es un pre-requisito general del proceso de fertilización en estas especies animales.

La capacitación incluye varias etapas secuenciales (3,4): una de ellas es la activación, que incluye un cambio en la velocidad y tipo de movimientos flagelares; otra etapa es la capacitación propiamente dicha, que implica un cambio en las estructuras y por lo tanto en las propiedades de la membrana del espermatozoide y culmina con la fusión entre las membranas plasmática y acrosomal externa en una tercera etapa, la reacción acrosomal. Las dos primeras fases de este proceso se llevan a cabo en el endometrio periovulatorio y la tercera en la región ampular de la trompa de fallopio.

No se ha establecido con precisión la interrelación entre el (los) factor(es) presente(s) en las secreciones del tracto genital femenino en el efecto estimulante en la movilidad y metabolismo del espermatozoide, sin embargo, se ha determinado que compuestos como los nucleóti-

dos cíclicos AMPc y GMPc, las hormonas esteroides estradiol y progesterona, la composición iónica del microambiente endometrial, los substratos, la albúmina, etc (5,6), tienen un papel importante.

Durante la primera etapa de la capacitación, simultáneamente al cambio en las características de la movilidad hacia un patrón vigoroso, progresivo y unidireccional, se observa también un incremento en la actividad metabólica del espermatozoide, ya que aumentan tanto el consumo de oxígeno como la actividad glicolítica, observándose también un cambio en la utilización preferencial de glucosa tanto por la vía de Embden-Meyerhoff como a través del ciclo de las pentosas ( 7 ).

Se ha reportado también que durante la capacitación *in vitro*, se llevan a cabo cambios en la distribución de las partículas intramembranales, tanto en el flagelo como en las regiones acrosomal y postacrosomal del espermatozoide de cobayo ( 8 ), fenómeno que es seguido por la reacción acrosomal ( 4 ). Estos cambios son más significativos debido a que algunos de los factores que inducen capacitación (fuerza iónica elevada, tripsina, lisolecitinas, neuraminidasa, virus Sendai) estimulan el agrupamiento de partículas intramembranales en otros tipos celulares y están estrechamente relacionados con la fusión membranar.

Se han descrito también cambios en el glicocalix de los espermatozoides sobre todo en la región acrosomal inducidos por líquido folicular ( 9 ); estos cambios son

debidos posiblemente a la pérdida de glicoproteínas superficiales. Por otra parte la conformación de las proteínas intrínsecas de la membrana acrosomal del espermatozoide humano y la membrana plasmática que la recubre, experimentan modificaciones al incubar las células espermáticas con AMPc y/o con líquido folicular (la conformación cambia de una estructura  $\beta$  muy estable hacia la hélice  $\alpha$  o el enrollamiento al azar, que son menos estables ( 10 ). Estos cambios estructurales parecen iniciarse por la fosforilación de proteínas membranales dependientes de AMPc ( 11 ).

Por lo tanto, la capacitación puede considerarse como un cambio en las macromoléculas membranales intrínsecas (proteínas, glico o lipoproteínas o lípidos), el cual produce una reducción progresiva del entrecruzamiento o bien un cambio en la estructura membranal hacia un punto en donde, dadas las condiciones apropiadas, el movimiento de las macromoléculas es posible, produciéndose cambios en la permeabilidad con la consecuente fusión membranal. Estos cambios en la movilidad membranal intrínseca se reflejan en la diferente proporción accesible de grupos funcionales como los grupos -SH membranales, cuya presencia es indispensable para que se lleven a cabo normalmente la capacitación y la singamia ( 12 ), así como también en la funcionalidad de receptores membranales para AMPc ( 13 ) y estrógenos ( 14 ) o de grupos funcionales relacionados con el transporte membranal de substratos y cofactores ( 14 ).

## REACCION ACROSOMAL.

La reacción acrosomal en el espermatozoide de mamífero es un proceso que incluye la fusión y vesiculación de la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática que la recubre. Este evento es tan esencial para la fertilización como la movilidad espermática adecuada, ya que permite la secreción y/o liberación de las enzimas que se encuentran tanto en la matriz acrosomal como unidas a las membranas (15), lo cual va a permitir a los espermatozoides penetrar las diferentes capas que recubren al ovocito (cumulus oophorus, corona radiata y zona pellucida), así como la membrana plasmática de esta célula (3,4).

Los eventos que suceden durante la capacitación y que participan en la facilitación de la reacción acrosomal en los mamíferos incluyen: la pérdida de proteínas estabilizantes de la superficie del espermatozoide (16,17); cambios en la fluidez membranal (18) y cambios ultraestructurales sutiles en los componentes de la membrana. La diferencia más importante entre la "reacción acrosomal" en los espermatozoides de invertebrados (19) y la reacción acrosomal en los espermatozoides de mamíferos es que esta última no incluye la producción de un filamento elongado de actina (proceso acrosomal).

Los eventos morfológicos considerados característicos de la reacción acrosomal en el espermatozoide de mamífero se han estudiado tanto en humanos como en conejos, roedores, cerdos, etc (4,20). Estudios de microscopía elec-

trónica de transmisión indican que la reacción acrosomal " verdadera " en el espermatozoide es una fusión membranal progresiva y organizada, seguida de la vesiculación en la que participan la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática que recubre la cabeza espermática y que tiene como consecuencia la liberación del contenido soluble del acrosoma (2,15).

Un criterio importante de microscopía electrónica para considerar la reacción acrosomal como " verdadera " es la fusión de la membrana acrosomal remanente con la membrana plasmática en la región ecuatorial, conservándose así la continuidad de las membranas espermáticas (2,8). Este proceso de fusión y vesiculación se inicia en el borde apical del acrosoma de los espermatozoides.

Existen también reacciones acrosomales " falsas ", las cuales se observan en los espermatozoides muertos o en degeneración ( 2 ). En este caso, los cambios membranales suceden al azar. Utilizando un microscopio de luz, la pérdida total o parcial del acrosoma en espermatozoides muy móviles se considera generalmente como representativa de una reacción acrosomal normal. En estudios con microscopía de luz puede observarse también un movimiento muy vigoroso del flagelo, denominado activación (21); la presencia de un porcentaje elevado de reacciones acrosomales en espermatozoides móviles, simultáneamente con un porcentaje elevado de activación, se considera generalmente como una indicación de capacitación y reacción acrosomal fisiológica.

*In vitro*, la reacción acrosomal se ha inducido mediante el uso de sistemas sincrónicos o no sincrónicos de incubación, así como también medios químicamente definidos o a los que se añaden fluídos biológicos como por ejemplo líquido folicular, sueros sanguíneos, extractos de adrenales, etc. (2,6).

En los sistemas de capacitación *in vitro* existen factores, además de su composición química, que influyen en el desarrollo de la reacción acrosomal, como por ejemplo el pH, la cantidad de espermatozoides utilizada en la incubación, la presión osmótica del medio y la temperatura de incubación ( 22 ).

A pesar de que *in vivo* la reacción acrosomal en los espermatozoides de mamífero pudiera ser instantánea, *in vitro* existen evidencias que sugieren que la reacción acrosomal tarda de 3-6 minutos en los espermatozoides de cobayo ( 21 ) y 10-20 minutos en los espermatozoides de hamster ( 23 ), después del período de capacitación considerado para cada especie. Debido a la evolución de los estudios de este proceso, se ha propuesto que el iniciador fisiológico pudiera ser desde un ión inorgánico mono o divalente, hasta alguna proteína presente en las secreciones de la región ampular de la trompa de falopio, en las diferentes capas que recubren al ovocito (2,21), o bien algunas moléculas con las características y propiedades de los glicosaminoglicanos (24).

Actualmente se considera que es la acción concertada del microambiente periovulatorio de la trompa de fallo-

pio, como por ejemplo cationes y aniones ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{PO}_4^{-3}$ ), prolactina y nucleótidos cíclicos (GMPc/AMPC) y los componentes bioquímicos tanto de la matriz acrosomal como de las membranas correspondientes a esta entidad, el mecanismo que inicia y regula la reacción acrosomal en los espermatozoides de mamífero.

#### PARTICIPACION DEL CALCIO Y OTROS CATIONES.

Una de las similitudes que existe entre los eventos de la exocitosis en las células secretoras y la reacción acrosomal, tanto en los espermatozoides de mamífero como en los de invertebrados, es el requerimiento de la interacción membranal y el influjo de calcio.

Los requerimientos de calcio para que se lleve a cabo la reacción acrosomal en los espermatozoides de invertebrado se conocen desde hace muchos años ( 2 ); sin embargo, no fue sino hasta el trabajo de Yanagimachi y Usui ( 21 ) que se demostró que el calcio es esencial para que suceda la reacción acrosomal *in vitro* en los espermatozoides de mamífero. En sus experimentos, la reacción acrosomal podía inducirse en pocos minutos en la mayoría de los espermatozoides cuando se añadía calcio a espermatozoides de cobayo preincubados, en un medio libre de calcio conteniendo albúmina. Otros investigadores ( 25,26 ) han utilizado el ionóforo A23187 para demostrar la participación del calcio en la reacción acrosomal en los espermatozoides de cobayo y de hamster. El ionóforo A23187 facilita la permeabilidad de la mem-

brana espermática al calcio, por lo que la fijación de calcio parece ser necesaria para que suceda este fenómeno. Posteriormente Babcock y col. observaron que un poco antes o simultáneamente a la reacción acrosomal en el espermatozoide de cobayo existe una fijación de Ca ( 27 ).

En este contexto Yanagimachi y Usui ( 21 ) sugirieron varios mecanismos posibles por los cuales el  $Ca^{++}$  podría participar en la reacción acrosomal: a) neutralizando las cargas negativas en las membranas de tal manera que puedan unirse y fusionarse; b) que el calcio se una a los fosfolípidos de la membrana e induzca de alguna manera cambios en la permeabilidad, lo que aumentaría el influjo de agua al acrosoma hinchándolo, por lo tanto aproximando las membranas; c) actuando a través de un efecto sobre las enzimas espermáticas o bien regulando el ensamble y desensamble de proteínas contráctiles ( 28 ). Todos estos efectos deben estar mediados a través de una proteína reguladora de calcio, la calmodulina, cuya concentración es particularmente elevada en el acrosoma del espermatozoide de mamífero ( 29 ).

Yanagimachi y Usui ( 21 ), han demostrado que el estroncio, pero no el magnesio, pueden reemplazar al calcio en el medio como un estímulo para la inducción de la reacción acrosomal (el magnesio tiene un efecto inhibitorio). Así mismo, Meizel y Lui ( 30 ) reportaron que la presencia de zinc en el medio de incubación inhibe la reacción acrosomal en el espermatozoide de hamster; sin embargo, Santos-Sacchi y Gordon demostraron que el

zinc tiene un efecto estimulador de la reacción acrosomal cuando actúa sinérgicamente con el GMPc ( 31 ).

Por otra parte, se ha señalado que los cationes monovalentes, principalmente el  $H^+$  y el  $K^+$  tienen también una participación importante en la regulación de la reacción acrosomal ( 2 ), así como también sustratos como el ácido pirúvico y el ácido láctico ( 32 ), catecolaminas ( 33 ), hormonas esteroides ( 29 ), nucleótidos cíclicos (34,35), etc.

El acrosoma en los espermatozoides de mamífero ha sido comparado con un lisosoma o con un gránulo secretor debido a su origen, estructura y fisiología (2,15), por lo que no es sorprendente que acrosomas, lisosomas y gránulos secretores puedan ser extraordinariamente similares, no solamente en sus características estructurales, sino también en sus expresiones funcionales.

Uno de los procesos que tienen en común estos organelos es la exocitosis, o un evento similar, ya que durante la secreción exócrina en las células somáticas se lleva a cabo la fusión de la membrana del gránulo secretor con la membrana plasmática de la célula, seguido de la ruptura de las membranas fusionadas y la liberación del contenido del gránulo, mecanismo semejante al descrito para la reacción acrosomal; sólo que mientras que en la exocitosis de células secretoras la integridad membranal se restaura después del proceso secretorio, en la reacción acrosomal las membranas fusionadas se vesiculan y

se pierden como parte del proceso. Otras similitudes descritas entre los eventos de la exocitosis y la reacción acrosomal en los mamíferos incluyen el requerimiento de calcio (4,15) y la desaparición de partículas intramembranales tanto en los sitios de exocitosis como en las membranas acrosomales (8,15).

Se ha sugerido que el funcionamiento de los gránulos secretores y los lisosomas en diferentes tipos de células como los islotes  $\beta$  del páncreas, las glándulas submaxilares, los melanocitos, las células tiroideas y de la glándula mamaria, los leucocitos polimorfonucleares, etc. está regulado, entre otros factores, mediante la interacción de microtúbulos y microfilamentos, los cuales a su vez están regulados a través de cambios endógenos en las concentraciones de calcio y nucleótidos cíclicos (AMP y GMP) como respuesta a primeros mensajeros específicos (28).

Por otra parte, diferentes investigadores (36,37) han demostrado que los compuestos que modifican la estructura y/o funcionamiento de estas entidades (colchicina, vinblastina, vincristina, citocalasinas) inhiben la liberación de los productos propios de cada tipo de célula.

En los acrosomas de invertebrados se ha descrito la presencia tanto de microtúbulos como de proteínas parecidas a actina (19) y se ha propuesto también que participan en la reacción acrosomal y la interacción de los gametos. Tilney y colaboradores han estudiado de manera extensa la presencia de filamentos de actina en los pro

cesos acrosomales de los espermatozoides de invertebrados marinos, así como también los mecanismos bioquímicos que regulan la polimerización de esta actina durante la " reacción acrosomal " (38-42). Además se ha sugerido que el papel fisiológico de los microtúbulos en la cabeza de los espermatozoides puede estar relacionado con el mantenimiento de la forma del acrosoma (43-44).

Existen algunos reportes relacionados con la presencia tanto de actina como de microtúbulos en la cabeza del espermatozoide de mamífero (45-52). Stambaugh y Smith (45) describieron la presencia de estructuras parecidas a microtúbulos en los acrosomas de los espermatozoides de mamíferos, formados a partir de la condensación de la matriz acrosomal; Peterson y colaboradores han demostrado que en la región acrosomal de los espermatozoides de cerdo se forman estructuras parecidas a microtúbulos y microfilamentos cuando sucede la vesiculación de las membranas plasmáticas de acrosomal externa (46), Clarke (47,48), Talbot (49), Campanella (50), Flaherty (51), Tamblyn (52), y sus grupos de colaboradores han reportado la presencia y localización de proteínas parecidas a actina en espermatozoides humanos, de conejo, cerdo, hamster, ratón, etc., por medio de estudios de inmunofluorescencia utilizando antisueros anti-actina; sin embargo, existen muchas discrepancias en cuanto a la localización comparativa de esta proteína en los espermatozoides principalmente en flagelos, región postacrosomal y acrosoma debido a la diferente naturaleza y heterogeneidad de los anticuerpos utilizados y a que es posible que la actina en los espermatozoides de mamífero ex-

perimente cambios durante la capacitación y reacción acrosomal, de manera similar a lo que sucede en invertebrados.

Estas estructuras, microtúbulos y microfilamentos, no han sido caracterizadas e identificadas en los espermatozoides de mamífero posiblemente debido a su labilidad y a que se pierden durante el procesamiento de las muestras para microscopía electrónica, así como también debido a que no se ha hecho un estudio detallado en relación con la secuencia de eventos programados durante la reacción acrosomal fisiológica.

Debido a la relación estructural y funcional que existe entre el acrosoma en los espermatozoides de mamífero y otros sistemas secretores en diferentes estirpes celulares, en donde el ensamble y desensamble de microtúbulos y microfilamentos regula los procesos de secreción, se propone que en el acrosoma (membranas y matriz acrosomal) de los espermatozoides de mamífero existen proteínas contráctiles como tubulina y actina, las cuales se ensamblan para formar microtúbulos y microfilamentos, participando así en la dinámica de la reacción acrosomal y permitiendo la secreción y/o liberación de las enzimas contenidas en esta entidad.

**OBJETIVOS**

1. Identificar la presencia de actina y tubulina en las estructuras acrosomales ( membranas y matriz acrosomal ).
- 2.- Determinar cuantitativamente la presencia de tubulina en el acrosoma.
- 3.- Determinar la participación de actina y tubulina en la dinámica de la reacción acrosomal del espermatozoide de mamífero.

C A P I T U L O    I I

## TUBULINA.

La tubulina es una proteína ácida con un punto isoeléctrico de 5.2-5.4 ( 53 ), que se ha aislado por diferentes métodos como dímeros con peso molecular de 115,000, denominados tubulina 6S. Estos dímeros pueden disociarse a su vez utilizando condiciones desnaturalizantes en dos subunidades similares identificadas como alfa y beta-tubulina.

El análisis de estas dos subunidades de la tubulina utilizando diferentes técnicas bioquímicas como electroforesis en geles de poliacrilamida, filtración en gel, análisis de secuencia de aminoácidos, etc., ha señalado que estas dos subunidades son químicamente diferentes, ya que por ejemplo la beta-tubulina tiene un peso molecular de 52,000 y la alfa-tubulina de 59,000, por lo que son separables bajo ciertas condiciones mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (dodecil sulfato de sodio) o bien isoelectroenfoque ( 59). La estequiometría de la  $\alpha$  y la  $\beta$ -tubulina es aproximadamente uno a uno ( 54 ) y su separación parece depender de su carga ( 53 ). La composición de aminoácidos de las dos subunidades es similar, pero se han encontrado algunas diferencias en sus mapas peptídicos ( 55 ).

La tubulina de los cilios de *Tetrahymena* contiene en su estructura dos moles de guanin nucleótidos; igualmente, la tubulina de cerebro generalmente se aísla con una molécula de GTP o GDP fuertemente unida y puede fijar otra molécula de GTP (56), por lo que puede decirse que

existen dos sitios (E,N) de fijación para guanin nucleótidos por dímero de tubulina; el intercambio con GTP libre se lleva a cabo más rápidamente en uno de ellos (sitio E) ( 53 ). La fijación en el sitio E es suficientemente lenta para sugerir que en este proceso está involucrado un cambio conformacional y se ha sugerido que el GTP unido protege a la tubulina de la desnaturalización ( 57 ).

El análisis elemental indica que las preparaciones de tubulina de cerebro contienen por lo menos una molécula de magnesio fuertemente unida por cada molécula del dímero de tubulina, esta proteína posee también la capacidad de unir otros cationes divalentes como el  $Ca^{++}$ , sin embargo, la concentración de calcio unido es 4 ó 5 veces menor que la de magnesio (58).

Es importante señalar que se ha demostrado que el calcio en concentraciones micromolares inhibe el ensamble de la tubulina en extractos crudos (28-59), proponiéndose que su efecto en el ensamble de microtúbulos está regulado a través de un componente bioquímico de la célula que une a este catión divalente con gran afinidad, la calmodulina ( 60 ).

Existen diferentes moléculas naturales que se fijan a la tubulina e interfieren con su función. Algunas de ellas tienen aplicación terapéutica como inhibidores de la mitosis como por ejemplo la colchicina, que se une específica, lenta e irreversiblemente a la tubulina 6S mol a mol, y bloquea el ensamble de los microtúbulos. ( 36 ).

La tubulina puede unir también otros alcaloides antimitóticos como la vinblastina, la vincristina (36) y la podofilotoxina (36); la adición de alcaloides vinca (vinblastina, vincristina y desacetilvinblastina) a la tubulina tanto *in vitro* (61) como en células metabólicamente activas (62), induce la formación de paracristales ácidos de este complejo.

Las evidencias actuales indican que los microtúbulos se forman a partir de una poza de tubulina presintetizada, y se ha sugerido que en cada tipo de células existen señales bioquímicas específicas que son las responsables de que se lleve a cabo el proceso de ensamble de la tubulina; señales que parecen ser diferentes dependiendo de las condiciones fisiológicas de la célula (28,59,63). También se ha señalado que se requieren otras moléculas como las proteínas asociadas o accesorias a los microtúbulos (MAPs) (64) para que estos procesos se lleven a cabo.

Por otra parte, varios reportes han demostrado que en presencia de concentraciones elevadas de magnesio o dimetilsulfóxido (DMSO) y otras condiciones no fisiológicas pueden obtenerse una gran variedad de estructuras polimórficas tales como anillos dobles, enrejados, listones, etc (64,65,66). El cobalto y el zinc también facilitan el ensamble de los microtúbulos, pero generalmente inducen la formación de varios tipos de estas estructuras polimórficas (67), como por ejemplo hojas y listones conteniendo cantidades variables de protofilamentos.

## MICROTUBULOS.

Los microtúbulos son organelos subcelulares aproximadamente de 240-250 Å de diámetro externo y 130-150 Å de diámetro interno que se encuentran prácticamente en todas las células eucarióticas ( 53,54,65 ).

Se ha señalado que su estructura general está formada por 13-15 protofilamentos asociados lateralmente, los cuales poseen un diámetro de aproximadamente 40-50 Å y están formados a su vez por 2 subunidades globulares ( 53,54,65 ).

Estas estructuras han sido implicadas en una gran variedad de funciones celulares, tales como movilidad (a través de cilios y flagelos), transporte, división celular (en el huso mitótico), flujo axoplasmático, secreción de enzimas, proteínas y hormonas, funcionamiento membranar, forma celular, etc., y pueden clasificarse en dos categorías generales: estables y lábiles.

Los microtúbulos que se encuentran en los axones y las dendritas del sistema nervioso central, en el huso mitótico de las células en división y en el citoplasma tanto de células animales como vegetales corresponden a la categoría de lábiles. Este tipo de microtúbulos puede despolimerizarse o romperse por agentes químicos tales como la colchicina, alcaloides vinca, podofilotoxina, o bien con baja temperatura o presión hidrostática alta (54). Además, no pueden aislarse intactos de las células debido a que están en un estado de equilibrio diná-

mico con la tubulina soluble citoplasmática y la célula controla la asociación y disociación de las subunidades dependiendo de sus necesidades fisiológicas.

Por el contrario, los microtúbulos estables, como los que se encuentran en los cilios y flagelos, no parecen estar en equilibrio con la tubulina soluble. Pueden aislarse como estructuras intactas, no se despolimerizan a baja temperatura o con presión y no se disocian por los compuestos químicos que destruyen los microtúbulos lábiles.

A pesar de que los microtúbulos difieren en su estabilidad y en su función, ambos tipos son similares tanto química como estructuralmente ( 65 ).

Bioquímicamente, los microtúbulos están formados principalmente de subunidades diméricas de tubulina 6S ( 53 ). Estas subunidades se reconocen como alfa- y beta-tubulinas. Además, como ya se mencionó para que se lleve a cabo el ensamble de los microtúbulos tanto en células metabólicamente activas como *in vitro* se requiere de la presencia de proteínas accesorias denominadas MAPs (microtubule associated proteins), ya que diferentes investigadores han demostrado que la tubulina 6S es incapaz de ensamblarse *in vitro* cuando carece de MAPs y que son las MAPs de alto peso molecular las que principalmente facilitan el ensamble ( 64 ). La relación de masa mínima para que se efectúe el ensamble es 0.3:1.0 (MAP: tubulina 6S) ( 68 ); al aumentarse esta proporción se incrementa la velocidad de ensamble.

Además de la participación de las MAPs en el ensamble de los microtúbulos *in vitro*, se ha postulado que una proteína denominada "tau", con peso molecular de 60-70,000, se necesita para la iniciación y elongación de los microtúbulos (64-69), posiblemente estabilizando las uniones intersubunidad.

#### ACTINA.

La actina es la proteína contráctil citoplasmática más caracterizada, es el principal componente de los filamentos delgados (microfilamentos) y es una proteína de una sola cadena que contiene 376 residuos de aminoácidos (70). De acuerdo con estos datos su peso molecular es de 42,300, que incluye una molécula de ATP y una de calcio iónico como grupos prostéticos.

La concentración de actina varía entre los diferentes tipos de células, pero siempre es una de las proteínas más abundantes. En la mayoría de las células, la actina corresponde aproximadamente al 1-5% de la proteína total y ésta puede ser hasta de 20-30% en células como las amibas y las plaquetas (70-71). Una gran proporción de esta proteína se encuentra como proteína estructural en las células no musculares.

La actina fue extraída y caracterizada por primera vez a partir del plasmodium del hongo *Physarum polycephalum* (72). Desde entonces, la presencia de actina ha sido demostrada en casi todos los tipos de células, tanto animales como vegetales y actualmente se conocen las se

cuencias de aminoácidos de las actinas de casi todas las ramas del árbol filogenético ( 70,73 ). Aproximadamente el 95% de los residuos son idénticos en las actinas muscular y citoplasmática, lo que demuestra que la estructura y función de esta proteína se han preservado a través de la filogénesis de los eucariontes; sin embargo, como grupo todas las actinas citoplasmáticas son más similares entre sí que con la actina muscular.

Todas las actinas son capaces de unir miosina reversiblemente y en presencia de ATP activan a la  $Mg^{++}$ -ATPasa en la miosina ( 70,72 ). En presencia de ATP y sales en concentraciones fisiológicas, el monómero de la actina, actina-G, se autoensambla o polimeriza espontáneamente para formar filamentos (actina-F). Este proceso convierte una mol de ATP (por cada actina-G) a ADP el cual permanece unido ( 28,72 ). Esta polimerización incluye 3 etapas principales: 1o). varios monómeros se unen para formar un oligómero, lo cual origina un núcleo; 2o). los monómeros rápidamente se añaden al núcleo para elongar el filamento, este filamento crece en ambas direcciones "*in vitro*", preferentemente hacia el extremo "barbado"; 3o). se forma un filamento largo por la unión de 2 filamentos extremo con extremo ( 72 ).

Una cierta cantidad de actina-G siempre coexiste con la actina-F en el medio y las actinas G- y F- están en equilibrio dinámico formando filamentos transitorios, localizados por ejemplo en los pseudópodos de las células móviles, en el anillo contráctil de las células en

división y en las regiones con fagocitosis activa ( 28, 54,74 ), así como microfilamentos más permanentes en regiones especializadas como las microvellosidades intestinales ( 72 ). Se ha señalado también la presencia de una poza de actina no polimerizada que se transforma rápidamente en actina-F cuando y donde se necesita, como por ejemplo en los espermatozoides de *Thyone* en donde se polimeriza para formar el conjunto de microfilamentos del proceso acrosomal ( 40,41 ).

Por otra parte, se ha señalado que las células deben tener mecanismos que especifican el número, los sitios de ensamble y el tamaño de sus filamentos de actina, además de tener el mecanismo para regular la interacción de los filamentos entre sí, con las membranas y con otras estructuras celulares como los microtúbulos ( 72 ).

El equilibrio dinámico entre la actina polimerizada y la no polimerizada en la célula está regulado no sólo por factores que interaccionan con la actina-G para mantenerla no polimerizada, sino también por una gran cantidad de proteínas accesorias ( 75 ). Estas proteínas actúan en los procesos biológicos regulando el ensamble de actina por ejemplo, recientemente se ha aislado una proteína que se une a la actina-G y evita la formación de actina-F ( 28,78 ). Esta proteína, llamada profilina, es una proteína básica de bajo peso molecular (16,000) que forma un complejo 1: 1 con la actina-G. Otra proteína que se une a actina ha sido caracterizada de músculo esquelético y macrófagos. Esta proteína denominada fi-

lamina (p.m. 2 x 250,000) forma un conglomerado filamentososo y gelatinoso con los filamentos de actina-F ( 28 ), e inhibe la activación de la ATPasa de la miosina por la actina ( 75,76 ). Otros ejemplos de estas proteínas son la fragmina, aislada del plasmodium del *Physarum* y la severina, aislada del moho *Dictyostelium*; los factores de gelificación como la gelsolina de los macrófagos y las proteínas que interaccionan con los filamentos y estabilizan a la actina-F, como la  $\beta$ -actinina ( 28,72, 75 ).

Aún antes de que se iniciaran las investigaciones en relación a la interacción miosina-activa citoplasmática, ya se había demostrado que la concentración de calcio libre controlaba la contracción citoplasmática y los movimientos que se llevan a cabo en el citoplasma ( 28 ). Actualmente, se ha encontrado que las diferentes acciones de la actina en una célula están reguladas por calcio y que la concentración crítica de este catión divalente para que estos procesos se lleven a cabo está en el rango micromolar. Se ha demostrado también que la concentración de calcio en unas células así como los efectos que éste ejercen en múltiples procesos bioquímicos, incluyendo la regulación de actina están regulados por la calmodulina ( 28,72 ).

#### MICROFILAMENTOS.

Los microfilamentos son estructuras largas y finas que se localizan asociadas o incluidas a la membrana plasmá

tica en todas las estirpes celulares: están distribuidos ( a menudo en forma paralela) en la región interior de la membrana plasmática y pueden extenderse como microvellosidades y micrópodos (28 ). La distribución (tanto en densidad como en complejidad) de los microfilamentos varía de célula a célula y generalmente refleja las características físicas de la célula o un estado fisiológico particular.

Los pseudópodos, microvellosidades, microespinas, etc., están formados casi exclusivamente por microfilamentos; así mismo, los microfilamentos han sido relacionados con diferentes procesos fisiológicos en las células, como por ejemplo la fagocitosis, fusión de lisosomas y vacuolas digestivas con la membrana plasmática, contracción de vacuolas, contracción celular, mitosis, citocinesis (28,70,72 ) y de manera importante con la reacción acrosomal en los espermatozoides de invertebrados ( 19,38 ).

Estos organelos tienen un diámetro de  $40-60 \text{ \AA}$  y están formados por una doble hélice de moléculas más o menos globulares de actina o una proteína muy similar a ella, que puede detectarse por anticuerpos contra actina y de coloración con meromiosina pesada (28,70,72 ).

La miosina, cuando se trata con una proteólisis suave, se rompe en la región flexible del polipéptido que separa la pieza de la cabeza (meromiosina pesada) del fragmento largo ( 28 ). Esta meromiosina pesada se une específicamente a la actina, formando complejos polarizados

en forma de cabeza de flecha (microfilamentos "decorados" con miosina), lo cual ha servido para determinar la similitud entre la actina muscular y las proteínas de los microfilamentos, así como la polaridad de estas estructuras, su extremo de elongación y despolimerización y la dirección de la contracción de la proteína.

Se ha reportado también que otras proteínas como la miosina, la tropomiosina, la troponina-T y la alfa-actinina parecen estar asociadas con estos filamentos ( 77 ).

*In vitro*, la elongación de un filamento se lleva a cabo en ambos extremos, por lo que el crecimiento es doble, pero los monómeros se adicionan más rápido en un extremo que en otro ( 78 ). Ambos extremos han sido identificados por decoración con fragmentos de miosina y el extremo "barbado" es el preferido para el ensamble en relación con el extremo "apuntado" ( 79 ). Se ha propuesto que debido a que los filamentos de actina son polares cada extremo debe poseer un equilibrio diferente, de tal manera que en condiciones de equilibrio polimerización-despolimerización, podría haber un flujo de monómeros a través del polímero. Este flujo conocido como "treadmilling" o "polimerización cabeza-cola" ocurre en presencia de un exceso de ATP y requiere que las concentraciones críticas en ambos extremos del filamento sean diferentes ( 78,80 ). Más recientemente, se ha demostrado que el intercambio de subunidades es dependiente de la concentración y tipo de los cationes presentes ( 81 ) y que la célula posee la capacidad de modificar

la velocidad del flujo, es decir, aumentarlo cuando se necesita un intercambio rápido o bien disminuirlo y por lo tanto limitar el flujo.

El número total de filamentos de actina en una célula probablemente está determinado por la concentración de actina accesible para polimerizarse ya que una parte parece estar secuestrada. Por ejemplo, en los espermatozoides de invertebrados existe una reserva de actina acoplada con otras proteínas, almacenada para polimerizarse durante la reacción acrosomal ( 19 ). Por otra parte, en otras células como ya se mencionó, una gran cantidad de actina está unida a la profilina, proteína que inhibe la nucleación para la polimerización de la actina.

A partir de estudios de microscopía electrónica se ha observado que algunos filamentos de actina crecen a partir de sitios de nucleación identificables morfológicamente. Por ejemplo, en los espermatozoides de invertebrados, el filamento de actina en el proceso acrosomal crece en dirección del extremo "barbado" a partir de una estructura denominada el actómero ( 40 ). Los componentes moleculares de ésta y otras estructuras de nucleación no se conocen, a excepción de la proteína " cubridora " de la amiba y la villina de las células epiteliales del intestino.

C A P I T U L O   I I I

## MATERIAL BIOLÓGICO.

Como modelo experimental se utilizaron cobayos macho, cepa Hartley adultos de 8-10 meses de edad, fértiles, los cuales fueron donados por el Bioterio Central del Instituto de Higiene de la S.S.A. Los animales se mantuvieron en el Bioterio Central del C.M.N. con un fotoperíodo 12:12, a una temperatura de  $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$  y con agua y purina *ad libitum*.

## OBTENCION DE ESPERMATOZOIDES.

Los cobayos se sacrificaron por dislocación cervical y los epidídimos se obtuvieron quirúrgicamente, colocándolos inmediatamente en una caja Petri con solución de NaCl 0.9% con la finalidad de eliminar la contaminación con sangre, ligándose posteriormente los conductos deferentes en su porción distal así como la porción distal de las caudas de los epidídimos.

Las caudas se colocaron en tubos de vidrio siliconizados que contenían 5 ml de NaCl- $\text{PO}_4$  0.154M pH 7.4 a  $37^{\circ}\text{C}$  instilándose 2 ml de esta solución a través de los conductos deferentes y seccionando la porción distal de las caudas. La suspensión celular obtenida se hizo pasar por una columna (pipeta Pasteur) en la que se empa-caron laxamente 30 mg de fibra de vidrio previamente lavada con HCl 2N y  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada hasta tener el pH del agua. La fibra de vidrio ya empacada se lavó 3 veces con 10 ml de solución fosfato-salina pH 7.4. Todo ésto

090355

se realizó con la finalidad de separar las células viables de las no viables y así obtener una población más homogénea de células ( 82 ).

Con el objeto de lavar y concentrar los espermatozoides, la suspensión celular obtenida después de pasar por la columna se centrifugó 2 veces a 300 xg por 7 minutos a 32-35°C, resuspendiendo las células con el Medio Capacitante Mínimo (MCM) propuesto por Barros y col ( 83 ) sin calcio. Las células se contaron utilizando una cámara de Neubauer y se ajustó la concentración celular por dilución a  $10^8$  células/ml.

#### OBTENCION DE FRACCION ENRIQUECIDA DE ACROSOMAS.

Las células obtenidas de la manera antes descrita se sometieron a homogeneización suave, utilizando un homogeneizador Potter-Elvehjem con émbolo de teflón. La homogeneización se llevó a cabo durante un minuto a una intensidad de "3". Posteriormente la suspensión se agitó en un vortex durante 3 minutos a una intensidad de "1" y 30 segundos a una intensidad de "10", comprobándose con un microscopio de contraste de fases y microscopía electrónica el desprendimiento de los acrosomas. Tanto el procedimiento de la homogeneización como la agitación se efectuó en un baño de hielo a 4°C.

Con la finalidad de eliminar los espermatozoides ya libres de acrosoma, la suspensión obtenida se centrifugó a 1000 xg durante 20 minutos a 4°C. En el sobrenadante de la centrifugación se obtiene lo que se denominó frac

ción enriquecida de acrosomas, formada por membranas acrosomales y matriz acrosomal.

La pureza de esta fracción se verificó mediante microscopía electrónica y bioquímicamente mediante la valoración de actividades enzimáticas consideradas marcadoras de membrana y de matriz acrosomal: 5' Nucleotidasa y  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPasa para membrana ( 84 ) y Acrosina e Hialuronidasa para matriz acrosomal ( 85,86 ).

#### OBTENCION DE MATRIZ ACROSOMAL.

Para obtener la matriz acrosomal, la fracción enriquecida de acrosomas obtenida de la manera antes descrita se centrifugó a 100,000 xg durante 30 minutos a 4°C, utilizando una microultracentrífuga (Beckman Airfuge) y se recolectó el sobrenadante.

En este sobrenadante se determinaron las actividades enzimáticas antes mencionadas.

#### OBTENCION DE MEMBRANAS ACROSOMALES.

Para el aislamiento de las membranas acrosomales se utilizaron espermatozoides a los cuales se les desprendió el acrosoma mediante el procedimiento mecánico ya descrito. La suspensión celular se ajustó por dilución a una concentración de  $25 \times 10^6$  espermatozoides/ml una vez que se llevó a cabo el desprendimiento de los acrosomas; se tomaron alícuotas de 4 ml las cuales se extra

tificaron sobre un gradiente discontinuo de sacarosa (1.3M, 1.2M, 1.08M y 0.9M) que se centrifugó a 67,000 xg durante 120 minutos a 4°C, utilizando un cabezal SW27 y una ultracentrífuga Beckman L5-75. La fracción membranal se obtuvo recolectando la interfase 0.9/1.08M en el gradiente de sacarosa, la que se diluyó con 3 volúmenes del amortiguador correspondiente a cada experimento y se centrifugó a 80,000 xg durante 30 minutos a 4°C, utilizando el cabezal SW27 en la ultracentrífuga Beckman L5-75. Las membranas acrosomales se recolectaron en el precipitado y se resuspendieron en 100-200 µl de la solución correspondiente.

En esta fracción membranal se efectuó también la determinación enzimática ya descrita.

Tanto en la fracción de matriz acrosomal, como en la fracción de membranas acrosomales se determinó la concentración de proteínas existente, utilizando el método de Lowry y col ( 87 ) y la concentración de ADN por el método descrito por Giles y Myers ( 88 ).

#### ELECTROFORESIS VERTICAL EN GELES DE POLIACRILAMIDA.

El análisis electroforético de las fracciones de matriz y membranas de acrosoma se efectuó utilizando geles verticales de poliacrilamida de acuerdo con la metodología descrita por Laemmli ( 89 ).

Los geles conteniendo 3% de acrilamida (gel de concen-

tración) y 8% de acrilamida (gel de resolución) se prepararon partiendo de una solución que contenía 30% de acrilamida y 0.8 % de N, N'-metilen-bis-acrilamida, añadiendo 0.1% de dodecil sulfato de sodio (SDS) y amortiguador Tris-HCl 0.375M, pH 8.8 ( en el caso del gel de resolución) y Tris-HCl 0.125M, pH 6.8 ( en el caso del gel de concentración) (concentración final). Los geles se polimerizaron con la adición de tetrametil-etilendiamina (TEMED) y persulfato de amonio; las concentraciones utilizadas para ambos compuestos fueron 0.004% en el gel de concentración y 0.025% en el gel de resolución.

Los geles se formaron en tubos de vidrio de 6 mm de diámetro interno, en los que se colocaron 10 cm de gel de resolución y 1 cm de gel de concentración.

La electroforesis se corrió aproximadamente 7 horas, utilizando un amortiguador Tris 0.025M, glicina 0.192M y SDS 0.1%, pH 8.3 y 3mA por gel.

Tanto las muestras de acrosoma, así como los estándares de peso molecular ( $\beta$ -galactosidasa P.M. 130,000, albúmina sérica P.M. 68,000, ovoalbúmina P.M. 43,000, quimotripsinógeno P.M. 25,700 y mioglobina P.M. 17,200), la tubulina y la actina (proporcionada por la Dra. Isaura Meza del I.P.N.) se procesaron de la siguiente manera: al equivalente de 150  $\mu$ g de proteína o bien 50  $\mu$ g del estándar de peso molecular, se añadió 50  $\mu$ l de amortiguador Tris-HCl 0.125M pH 6.8, 20  $\mu$ l de SDS 20%, 10  $\mu$ l  $\beta$ -mercaptoetanol, 4  $\mu$ l de azul de bromofenol 0.02 % y

50  $\mu$ l de glicerol. Las proteínas se disociaron completamente colocando las muestras 2 minutos en un baño de agua hirviendo.

Una vez que el azul de bromofenol llegó a 0.5 cm del final del gel se suspendió la corriente, se procedió a liberar los geles de los tubos, se marcó el frente del gel con tinta china y las proteínas se fijaron con ácido tricloroacético 12.5% durante 18-20 horas, a temperatura ambiente, tiñéndose posteriormente con azul brillante de coomassie 0.2% en etanol: ácido acético: agua (45:10:45) por 30 minutos a 50°C. Los geles se destiñeron 2 veces con etanol: ácido acético: agua (25:10:65) por 30 minutos a 50°C y con cambios sucesivos de esta solución a temperatura ambiente hasta que el fondo del gel fue claro, según la metodología descrita por Berkowitz y col (90).

Para obtener los perfiles densitométricos de los geles, éstos se barrieron a 550 nm con un espectrofotómetro Gilford 2400-S utilizando tanto una celdilla de cuarzo así como el dispositivo para contener al gel (91).

#### OBTENCION Y PURIFICACION DE TUBULINA.

La tubulina utilizada en este estudio se aisló a partir de corteza cerebral, mediante el procedimiento de ensamblaje-desensamblaje de esta proteína, dependiente de temperatura, reportado por Berkowitz y col (90). Para esto, se utilizaron ratas macho, cepa Sprague Dawley, adultos de 300-400 g, que se sacrificaron por decapitación.

Después de disecar las cortezas cerebrales, se pesaron 10 g de tejido los cuales se homogeneizaron a 4°C en un homogeneizador Potter-Elvehjem con émbolo de teflón, utilizando 7.5 ml de una solución amortiguadora (PM4M) con la composición siguiente: ácido piperacín-N, N'-bis (2-etano) sulfónico (PIPES)-NaOH, 100 mM; ácido etilenglicol bis (eter β-aminoetílico)-N<sub>2</sub>,N'<sub>2</sub> -tetraacético (EGTA), 2 mM; MgSO<sub>4</sub>, 1mM; glicerol, 4M; pH 6.9, adicionado de GTP 2.5 mM. Las velocidades de homogeneización fueron "3" y "9" durante 50 y 10 segundos respectivamente.

El homogeneizado se centrifugó 15 minutos a 10,400 xg a 4°C en una centrífuga refrigerada Sorvall RC2-B, utilizando un cabezal SS-34. El sobrenadante se recuperó y se centrifugó a 100,000 xg durante 70 minutos a 4°C en una ultracentrífuga Beckman L5-75, utilizando un cabezal SW-40. Se recolectó el sobrenadante (So), se le adicionó GTP 0.5 mM, se incubó durante 45 minutos a 37°C para permitir el ensamble de los microtúbulos y transcurrido el período de incubación se centrifugó a 100,000 xg durante 45 minutos a 25°C, utilizando la misma centrífuga y cabezal. Las pastillas obtenidas se resuspendieron en 4-5 volúmenes de PM frío (el mismo PM4M pero sin glicerol) adicionado de GTP 0.5 mM, con la finalidad de desensamblar la tubulina y se centrifugó a 100,000 xg por 30 minutos a 4°C para retirar el material no disociado.

El sobrenadante (1XMT) se recolectó, se diluyó 1: 1 con PM8M (la misma composición del PM4M pero con glicerol 8M) adicionado de GTP 0.5 mM y se sometió a uno o dos

ciclos más de polimerización-despolimerización para obtener tubulina con 2 ó 3 ciclos de purificación (2XMT y 3XMT), la cual se guardó en alícuotas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Antes de utilizarse, la tubulina se sometió a un ciclo de polimerización y despolimerización con temperatura y se determinó la concentración de proteínas utilizando el método de Lowry y col ( 87 ).

#### IDENTIFICACION POR MEDIO DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.

Para identificar cualitativamente la presencia y distribución de la actina y la tubulina en los espermatozoides de cobayo se utilizó la técnica de inmunofluorescencia, por medio de anticuerpos monoclonales para  $\alpha$  y  $\beta$  -tubulina, así como para actina ( 92,93,94 ) y un 2° anticuerpo (IgG) marcado con isotiocianato de fluoresceína.

Para efectuar esta parte del trabajo se utilizaron espermatozoides obtenidos por el método ya descrito. Alícuotas de  $50 \times 10^6$  células se incubaron durante 2 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  con MCM con calcio (1.15 mM), con la finalidad de inducirles capacitación.

Estas células, así como espermatozoides intactos, se fijaron posteriormente con formaldehído 3.5% durante 20 minutos a temperatura ambiente, se lavaron 3 veces con solución fosfato-salina (PBS) (NaCl, 137 mM; KCl, 2.7 mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.5 mM;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 8 mM), pH 7.4, para eliminar el exceso de fijador y se permeabilizaron ( la mitad de los espermatozoides) incubando con metanol y acetona a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 4 y 2 minutos respectivamente. ( 92,93,94 ).

Tanto las células permeabilizadas como las no permeabilizadas se resuspendieron con PBS adicionada de albúmina 0.1%, lavándose 2 veces y volviéndose a contar por medio de una cámara de Neubauer.

Se pusieron alícuotas de  $10 \times 10^6$  células en tubos de polietileno y se les añadieron los anticuerpos monoclonales (dilución 1:1000), incubándose durante 16-18 horas a 4°C, después de lo cual se lavaron 3 veces con PBS-albúmina con la finalidad de eliminar el anticuerpo no unido y se incubaron con IgG-fluoresceína (dilución 1:20) por 1 hora a 4°C. Después de eliminar el exceso de marca fluorescente por medio de lavados con PBS-albúmina, las células se observaron con un microscopio Reichert-Polivar utilizando el objetivo de inmersión 100X y los aditamentos para epifluorescencia (filtro de excitación azul 455-490 nm y filtro de barrera azul para 515 nm).

La dilución de los anticuerpos se llevó a cabo con PBS-albúmina a la que se adicionó azida de sodio 0.1 % como conservador y una vez diluidos se guardaron a 0-5°C.

#### DETERMINACION DE LA FIJACION DE COLCHICINA-H<sup>3</sup>.

La valoración cuantitativa de la tubulina presente en la matriz acrosomal y membranas acrosomales se realizó utilizando el radio-análisis descrito por Sherline y col (95). Las muestras biológicas se obtuvieron en este caso utilizando una solución amortiguadora con la siguiente composición: pirofosfato de sodio ( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ),

0.05 M;  $MgCl_2$ , 2.5 mM; sacarosa, 0.24 M; GTP, 0.1 mM; pH 6.5 (PMSG); esta composición de la solución amortiguadora permite la preservación de las características estructurales y propiedades de la tubulina.

Se utilizaron alícuotas de 100 a 2000  $\mu g$  de proteínas para la fracción de matriz acrosomal y de 10-50  $\mu g$  de proteínas para la fracción de membranas acrosomales, así como blancos que contenían 500  $\mu l$  de PMSG sin las proteínas en cuestión.

El volumen de incubación se ajustó a 500  $\mu l$  con PMSG y se añadió a cada tubo 10  $\mu l$  de una solución de colchicina- $H^3$  0.11 mM ( + 50,000 CPM). Esta solución se preparó colocando en un tubo de poliestireno protegido de la luz, la alícuota correspondiente de colchicina- $H^3$  ( 30 Ci/mmol) en benceno-etanol 9:1 y evaporando a sequedad bajo una corriente de nitrógeno. La colchicina- $H^3$  se eluyó con una solución acuosa 0.11 mM de colchicina fría.

La incubación de las proteínas con la colchicina- $H^3$  se realizó durante 90 minutos a 37°C y la reacción se paró añadiendo 1 ml de  $H_2O$  desionizada que contenía 3 mg de carbón activado con la finalidad de separar la colchicina- $H^3$  unida de la libre. Para determinar las cuentas totales o CPM del estándar, a uno de los blancos se le añadió 1 ml de  $H_2O$  desionizada en vez de la suspensión de carbón activado. Todos los tubos se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 2,200 xg por 10 minutos a 4°C, tomándose alícuotas de

400  $\mu$ l de los sobrenadantes en los que se evaluó la radiactividad utilizando un contador de centelleo líquido Packard Tri Carb mod. 3390.

La cantidad de colchicina unida a la tubulina se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$\frac{[\text{CPM(muestra)} - \text{CPM(blanco)}]}{\text{CPM (estándar)}} \times 1.1 \text{ nmolas de colchicina}$$

considerando que una mol de colchicina se une con una mol de tubulina en condiciones de saturación.

#### INTERFERENCIA CON LA REACCION ACROSOMAL DE LOS ESPERMATÓZOIDES MEDIANTE LA INCUBACION CON INHIBIDORES.

La incubación con inhibidores específicos para microtúbulos y microfilamentos, para valorar la participación de actina y tubulina en la reacción acrosomal, se llevó a cabo de la siguiente manera:

Con la finalidad de seleccionar las concentraciones óptimas en las cuales los inhibidores interfieren con la reacción acrosomal sin modificar las características metabólicas de los espermatozoides, se probaron diferentes concentraciones (1  $\mu$ M-1mM) de citocalasina B, colchicina y vincristina, encontrándose que las concentraciones de 10, 25 y 50  $\mu$ M cumplen los requerimientos para este estudio. Los compuestos utilizados fueron citocalasina B, colchicina y vincristina.

**090355**

Alícuotas de  $50 \times 10^6$  espermatozoides en MCM sin calcio se preincubaron durante 10 minutos a  $37^\circ\text{C}$ , en presencia de las concentraciones antes mencionadas de los inhibidores, así como su control respectivo (espermatozoides sin tratamiento). Pasado este tiempo se añadió  $\text{CaCl}_2$  a una concentración 1.15 mM final a los sistemas de incubación con la finalidad de que las células realizaran el proceso de capacitación-reacción acrosomal (83 ), y subsecuentemente se incubó durante 4 horas a  $37^\circ\text{C}$  en una atmósfera de 5%  $\text{CO}_2$  + aire.

Cada hora, durante el período de incubación de 4 horas, se tomaron alícuotas de la suspensión de espermatozoides, las que se colocaron en un portaobjetos escavado precalentado a  $37^\circ\text{C}$ , se cubrieron con un cubreobjetos y se observaron con un microscopio de contraste de fases Carl Zeiss equipado con una platina termorregulable a  $37^\circ\text{C}$  para valorar el tanto por ciento de espermatozoides móviles y el tanto por ciento de espermatozoides móviles que tenían reacción acrosomal.

El tanto por ciento de reacción acrosomal en los espermatozoides se calculó como sigue:

$$\frac{\text{total de espermatozoides móviles sin acrosoma} \times 100}{\text{total de espermatozoides móviles}}$$

Simultáneamente a esta evaluación se tomaron alícuotas de espermatozoides tanto de la fase experimental como de los controles, para valorar la viabilidad celular y la movilidad espermática.

Para evaluar la viabilidad celular se utilizó la técnica de exclusión de colorantes vitales ( 96 ), que consiste en diluir la alícuota de espermatozoides 1:1 con azul de tripano 2% en MCM, pH 7.4 e incubar durante 15 minutos a 37°C, evaluándose el tanto por ciento de espermatozoides que no se tiñeron de azul, utilizando un microscopio de contraste de fases.

La citocalasina B, así como la colchicina se disolvieron en etanol y se guardaron en alícuotas de 100 µl a -20°C. La concentración final de etanol en los sistemas de incubación fue siempre menor a 1%, evaluándose tubos control con esta cantidad de etanol. La vincristina por ser sulfato se disolvió directamente en MCM sin calcio, haciéndose una solución fresca para cada experimento.

#### EVALUACION DE LA MOVILIDAD ESPERMATICA.

La evaluación cuantitativa de la movilidad de los espermatozoides durante el período de 4 horas de incubación se realizó espectrofotométricamente mediante el método propuesto por Atherton y col ( 97 ). Esta evaluación se basa en las características de anisotropía óptica que presentan las partículas elongadas en un flujo ( 98 ). En condiciones de flujo continuo, tanto las partículas elongadas como los espermatozoides presentan una reotaxis positiva y al detener el flujo se inicia un período de reorientación al azar, mismo que se traduce en un cambio en la densidad óptica, el cual es proporcional a la movilidad de los espermatozoides en este caso (97,98).

El índice de movilidad espermática (IME) se determinó de la siguiente manera: se utilizó una celdilla de flujo (diseñada y proporcionada por el Dr. Robert W. Atherton de la Universidad de Wyoming, E.U.A.), a través de la cual se hizo pasar una alícuota de  $50 \times 10^6$  espermatozoides diluidos en un volumen final de 9 ml de MCM, a una velocidad constante de 7 ml/min. Los registros de densidad óptica antes y después de detener el flujo se efectuaron a 475 nm utilizando un espectrofotómetro Unicam SP800-B. La fórmula utilizada para calcular el IME es la siguiente ( 97 ):

$$\frac{DOi - DOf}{DOi} \times 100$$

en donde DOi = densidad óptica al iniciar el flujo;

DOf = densidad óptica 30 segundos después de detener el flujo.

## REACTIVOS.

Los reactivos utilizados se obtuvieron de las siguientes casas comerciales: reactivos para electroforesis de Bio Rad; anticuerpos monoclonales de Amersham; colchicina- $H^3$  de New England Nuclear; citocalasina B de Aldrich Chemical Co.; colchicina de Merck; vincristina de Eli Lilly & Co..

Todos los demás reactivos fueron de grado analítico y se obtuvieron de Sigma Chemical Co. y Merck.

C A P I T U L O    I V

## RESULTADOS.

En la Tabla 1 se presentan los resultados obtenidos de la valoración bioquímica de las fracciones de membranas acrosomales y matriz acrosomal.

## ELECTROFORESIS.

En la Figura 1 se presentan los perfiles densitométricos característicos correspondientes a los geles de poli-acrilamida-SDS que contenían actina, así como tubulina de 2 ciclos de polimerización despolimerización. Puede observarse, de acuerdo al patrón correspondiente y al reporte de Berkowitz y col ( 90 ), que la tubulina aislada de cerebro de rata tiene una pureza adecuada. Puede observarse también que además de las bandas principales que corresponden a estas dos proteínas, existen otras proteínas asociadas con pesos moleculares elevados, intermedios o bajos, que copurifican con actina y tubulina. La presencia y copurificación de estas proteínas, denominadas "proteínas asociadas a microtúbulos (MAPS)" y "proteínas asociadas a actina", respectivamente, ha sido reportada por diferentes investigadores ( 64, 75 ).

En este estudio el patrón electroforético de la tubulina, muestra además la presencia de una proteína con peso molecular aproximado de 60-70,000, la cual podría corresponder al factor denominado "tau" requerido para el ensamble de los microtúbulos ( 69 ).

Con respecto al análisis electroforético de las proteínas obtenidas de matriz y membranas acrosomales, efectuado con la finalidad de identificar la presencia de actina y tubulina en el acrosoma de los espermatozoides de cobayo, es importante señalar que los perfiles densitométricos que se presentan en la figura 2 se obtuvieron de manera consistente; esto permite señalar la presencia de estas proteínas en ambas fracciones subcelulares ya que se observó la presencia de bandas de proteínas que coinciden con las características electroforéticas (movilidad relativa y peso molecular aproximado) de actina y tubulina en las condiciones experimentales utilizadas.

#### INMUNOFLORESCENCIA INDIRECTA UTILIZANDO ANTICUERPOS MONOCLONALES.

Como controles para esta fase experimental se utilizaron los siguientes parámetros:

- 1.- Incubación solamente con IgG-Fluoresceína, sustituyendo al anticuerpo monoclonal por PBS-albúmina.
- 2.- Incubación con el anticuerpo monoclonal previamente incubado con tubulina o actina.

En ninguno de los dos casos se observó fluorescencia en los espermatozoides.

Cuando los espermatozoides de cobayo se incubaron en presencia de los anticuerpos monoclonales anti  $\alpha$ -tu-

bulina,  $\beta$ -tubulina y actina, se encontró en todos los casos fluorescencia en la región del flagelo; en el caso del anticuerpo anti  $\alpha$ -tubulina, se observó un punto de fluorescencia muy brillante en la punta del flagelo, el cual corresponde a la punta del axonema ( Figs. 3-4).

#### Anticuerpo anti $\alpha$ -tubulina.-

En las figuras 3 y 4 pueden observarse los resultados obtenidos en esta fase experimental, en donde se localizó la presencia de la subunidad  $\alpha$  de la tubulina. En los espermatozoides con acrosoma se observó fluorescencia localizada en el borde de la región acrosomal (membrana plasmática o membrana acrosomal externa). En los espermatozoides con reacción acrosomal no se detectó fluorescencia en la región acrosomal y solamente se pudo observar ésta en el flagelo. Los resultados obtenidos con este anticuerpo fueron similares en los espermatozoides sin permeabilizar y permeabilizados.

#### Anticuerpo anti $\beta$ -tubulina.-

La subunidad  $\beta$  de la tubulina se localizó distribuida como sigue en los espermatozoides de cobayo. En las figuras 3 y 4, podemos ver que en los espermatozoides que habían experimentado reacción acrosomal se encontró fluorescencia distribuida como un puntilleo en la región del acrosoma. Esta fluorescencia se observó solamente en los espermatozoides sin permeabilizar, ya que

al incubar con metanol-acetona a  $-20^{\circ}\text{C}$  se perdió este patrón; no así el del flagelo, el cual fue constante. En los espermatozoides con acrosoma no fue posible detectar fluorescencia en el acrosoma, observándose solamente en el flagelo, tanto en los espermatozoides previamente permeabilizados como en los que no experimentaron este proceso.

Anticuerpos anti  $\alpha$ - y anti  $\beta$ -tubulina.

Con la finalidad de detectar la presencia de tubulina total en los espermatozoides, éstos se incubaron simultáneamente con los anticuerpos monoclonales anti  $\alpha$  y anti  $\beta$  -tubulina.

En este caso, los patrones de fluorescencia observados en los espermatozoides fueron la sumatoria de los observados al incubar con estos anticuerpos por separado. En los espermatozoides con acrosomas se localizó fluorescencia en la región acrosomal, la cual fue más abundante que cuando se utilizó un solo anticuerpo. Lo mismo sucedió con la fluorescencia observada en el flagelo. Este patrón se observó también en los espermatozoides con o sin permeabilización previa a la incubación con los anticuerpos monoclonales (Figs. 3 ,4).

En los espermatozoides sin acrosoma también se localizó el patrón característico de puntilleo de fluorescencia en el acrosoma, como puede observarse en las figuras 3 y 4, el cual fue visible solamente en los espermatozoides sin permeabilizar lo que sugiere la presencia de un

antígeno superficial en esta región.

Anticuerpo anti-actina.

En este caso, además de la fluorescencia en el flagelo, en los espermatozoides con acrosoma (Figs. 3, 4) se localizó una banda fluorescente en la región correspondiente a la zona ecuatorial de la cabeza de los espermatozoides. En los espermatozoides sin acrosoma (Figs. 3, 4) se localizó una fluorescencia muy abundante y distribuida homogéneamente en la región acrosomal.

Estos patrones se observaron solamente en los espermatozoides sin permeabilizar, ya que en los espermatozoides permeabilizados con metanol y acetona, no fue posible detectar ningún tipo de fluorescencia en la región acrosomal.

#### FIJACION DE COLCHICINA-H<sup>3</sup>

Las figuras 5 y 6 representan la fijación de la colchicina-H<sup>3</sup> a la tubulina presente en la matriz acrosomal y las membranas acrosomales respectivamente, utilizando diferentes concentraciones de proteínas obtenidas de estas fracciones subcelulares.

En ambos casos se observó una buena linealidad en relación al incremento en la concentración de proteínas y por lo tanto a la cantidad de tubulina presente, lo cual permitió calcular concentraciones de  $18.08 \pm 2.61$

090355

pmolas de tubulina/mg de proteína de matriz acrosomal y  $318.2 \pm 108.24$  pmolas de tubulina/mg de proteína de membranas acrosomales. Es necesario mencionar que la cantidad de proteína encontrada en estas fracciones fue  $1.27 \pm 0.12$  mg de proteína/ $10^8$  espermatozoides en el caso de la matriz acrosomal y  $0.07 \pm 0.01$  mg de proteína/ $10^8$  espermatozoides en el caso de las membranas acrosomales, (Tabla 1).

Sin embargo, la cantidad de colchicina unida a las proteínas no fue completamente proporcional, sobre todo en el caso de las membranas, debido posiblemente a la adsorción parcial del complejo colchicina-proteína por el carbón activado, lo que produjo desviaciones estándar mayores a 10%. Este fenómeno no se modificó al disminuir la concentración de carbón activado a 1 mg/sistema de incubación.

Es importante mencionar que no se encontró fijación de colchicina- $H^3$  a las muestras cuando éstas se trataron con 1% de  $\beta$ -mercaptoetanol o del detergente SDS, ni cuando se añadió el carbón inmediatamente después de la adición de la colchicina- $H^3$ , lo que señala la especificidad de la interacción.

#### INCUBACION CON INHIBIDORES DE MICROTUBULOS Y MICROFILAMENTOS.

Los espermatozoides de cobayo se incubaron durante 4 horas en presencia de los inhibidores específicos para actina y tubulina (citocalasina B, colchicina y vincristina),

utilizando las siguientes concentraciones: 10, 25 y 50  $\mu\text{M}$  de cada uno de ellos. Debido a que estos compuestos pueden tener efectos sobre la fisiología celular que no están relacionados con su efecto sobre las proteínas contráctiles ( 99,100 ), se tomaron como parámetros de referencia de la integridad y buen funcionamiento de los espermatozoides y por lo tanto de la interacción específica de los compuestos con las proteínas contráctiles en el acrosoma, la viabilidad celular y la movilidad de los espermatozoides durante el período de incubación de 4 horas.

A este respecto, la viabilidad celular se mantuvo por encima de 70% durante todo el período de incubación, tanto en los sistemas incubados con los compuestos antes mencionados como en los controles.

La evaluación del índice de movilidad espermática (IME) se realizó simultáneamente a la evaluación de la reacción acrosomal, mediante el método espectrofotométrico ya descrito ( 97 ).

En la figura 7 se presentan los IME obtenidos en los casos en que se incubó con la concentración de 50  $\mu\text{M}$  de citocalasina B, colchicina o vincristina, así como de los espermatozoides control, y puede observarse que ni la citocalasina B ni la colchicina produjeron diferencias significativas en la movilidad, al comparar sus trazos correspondientes con los del control. Por otra parte, los resultados obtenidos al incubarse en presencia de vincristina indican que este compuesto indujo un in-

cremento significativo ( $P < 0.005$ ) en la movilidad de los espermatozoides durante la primera, segunda y cuarta hora del período de incubación.

Con la finalidad de evaluar la participación de proteínas parecidas a actina en la reacción acrosomal se añadió al sistema no sincrónico de incubación para inducir reacción acrosomal en espermatozoides de cobayo, citocalasina B a las concentraciones ya mencionadas. A la concentración de  $50 \mu\text{M}$ , este compuesto redujo 34% el número de espermatozoides con reacción acrosomal después de 4 horas de incubación (Fig. 8). En el control se encontró 78% de espermatozoides con reacción acrosomal en este período, lo cual coincide con el tanto por ciento esperado en estas condiciones experimentales ( 83 ).

Por otra parte, la participación de tubulina en la reacción acrosomal de los espermatozoides de cobayo se evaluó añadiendo colchicina y vincristina a los sistemas de incubación. Colchicina indujo en todos los casos una inhibición significativa, dependiente de la concentración, en la reacción acrosomal. En presencia de colchicina  $50 \mu\text{M}$ , el tanto por ciento de espermatozoides con reacción acrosomal después de 4 horas de incubación fue de 25%, comparado con el 78% observado en el control (figura 9), lo que indica una inhibición de 65% en este proceso.

Así mismo, el efecto de vincristina sobre la tubulina acrosomal dió como resultado que al utilizar este alcaloide en una concentración de  $50 \mu\text{M}$  se produjera una in

hibición de 42% en la reacción acrosomal (Fig.10).

En el caso de todos los compuestos mencionados, con todas las concentraciones utilizadas se obtuvo una inhibición significativa de la reacción acrosomal después de 4 horas de incubación (Tabla 2).

Es interesante señalar que cuando se incubó a los espermatozoides en presencia de vincristina 25 y 50  $\mu\text{M}$ , se encontró un incremento significativo en el número de espermatozoides con reacción acrosomal en relación con el control ( $P < 0.005$ ) después de una hora de incubación (Fig.10). Un efecto similar pero menos evidente se observó con vincristina 10  $\mu\text{M}$  y con citocalasina B 10 y 25  $\mu\text{M}$  (Figs. 8, 10)

Estos resultados parecen ser un efecto bifásico de estos compuestos en la reacción acrosomal de los espermatozoides de cobayo.

Finalmente, cuando se incubó simultáneamente en presencia de citocalasina B y colchicina se obtuvo una inhibición significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) de la reacción acrosomal cuando ambos compuestos se utilizaron en concentraciones de 50  $\mu\text{M}$  (Fig.11). En los otros tipos de combinaciones de citocalasina B y colchicina, la inhibición de la reacción acrosomal observada no fue significativamente diferente a la observada al incubar solamente con colchicina (Tabla 3).

FIGURA 1

Perfiles densitométricos característicos, obtenidos a 550 nm, de los geles de poliacrilamida-SDS que contenían tubulina y actina. En la barra vertical está representado el comportamiento electroforético de los marcadores de peso molecular utilizados, en las condiciones experimentales descritas.

FIGURA 2

Perfiles densitométricos característicos, obtenidos a 550 nm, de los geles de poliacrilamina-SDS que contenían proteínas obtenidas de membranas acrosomales y matriz acrosomal, según se describe en la sección de material y métodos. En la barra vertical están colocados los marcadores de peso molecular según su comportamiento electroforético bajo las condiciones experimentales utilizadas.

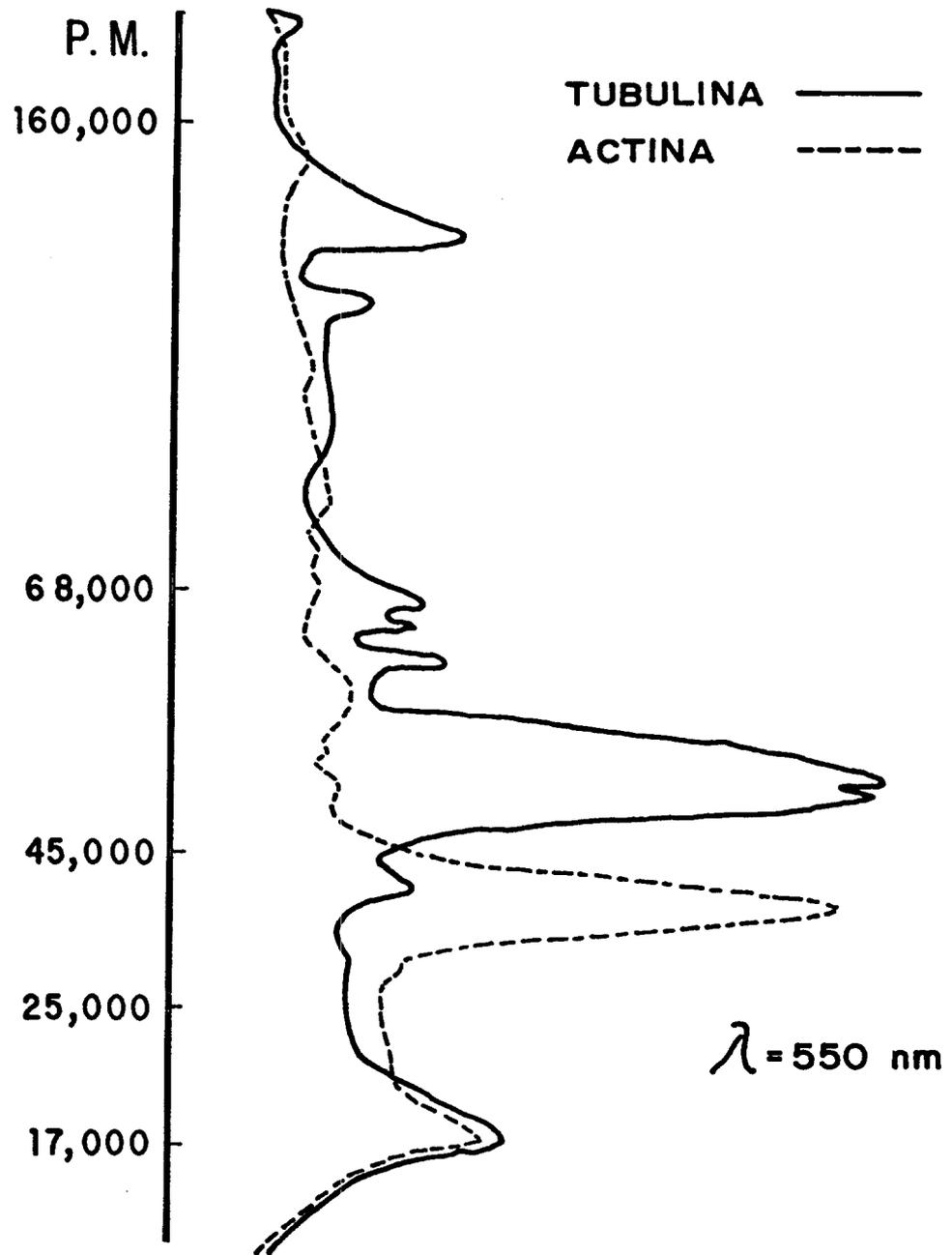


FIGURA 1

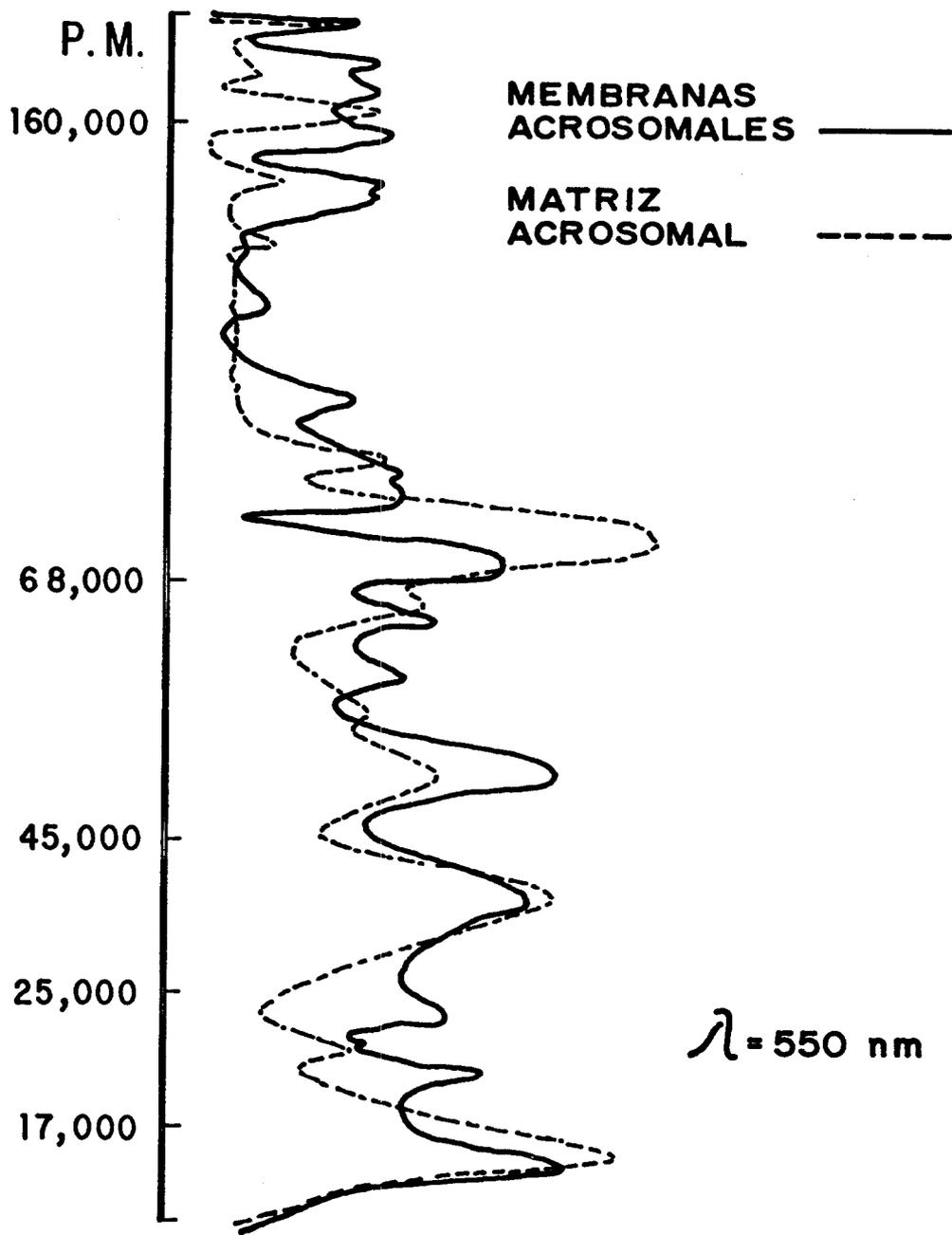
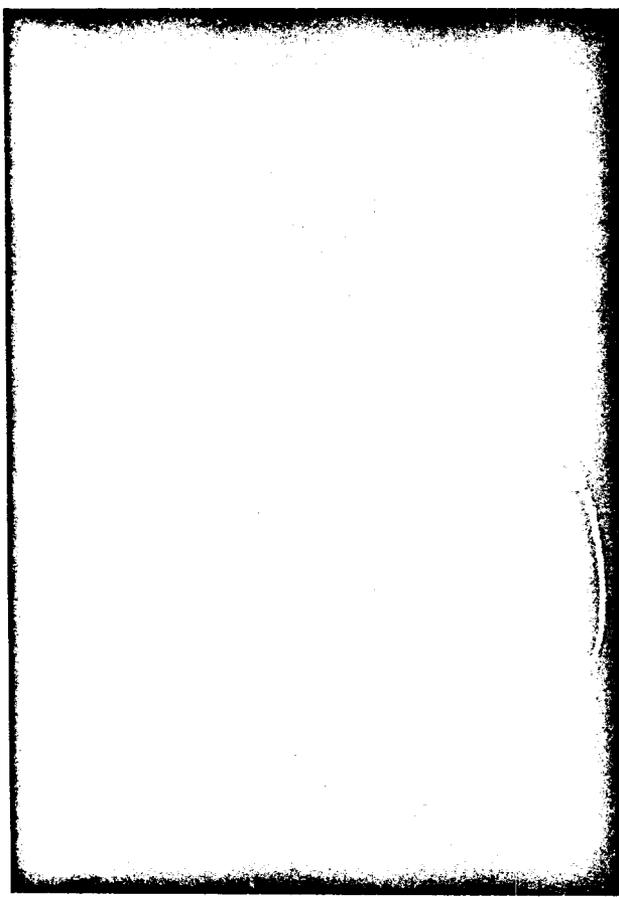
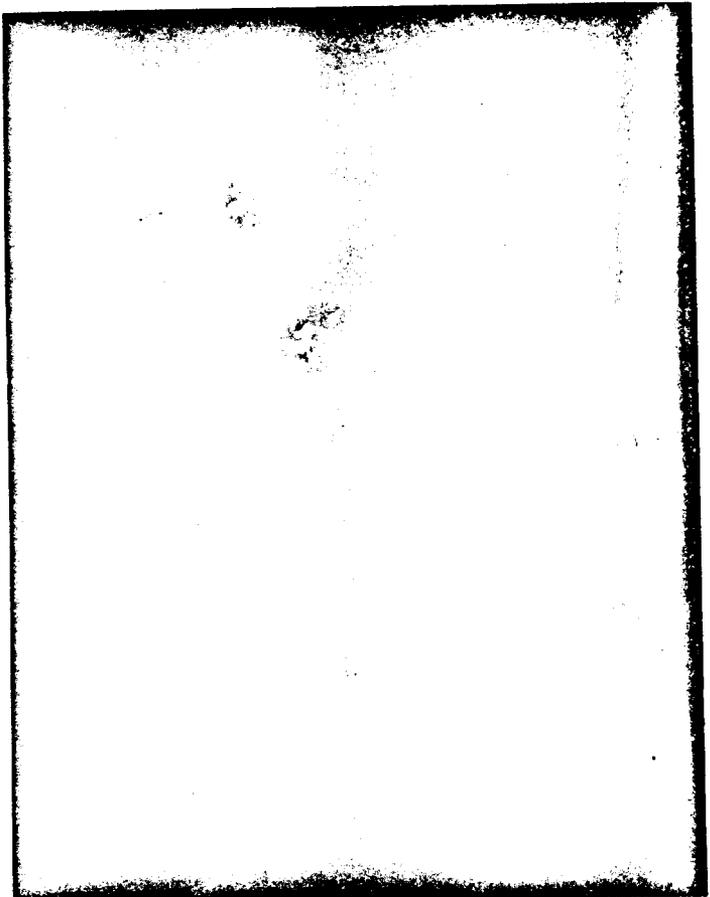


FIGURA 2



A



B



C

FIGURA 3

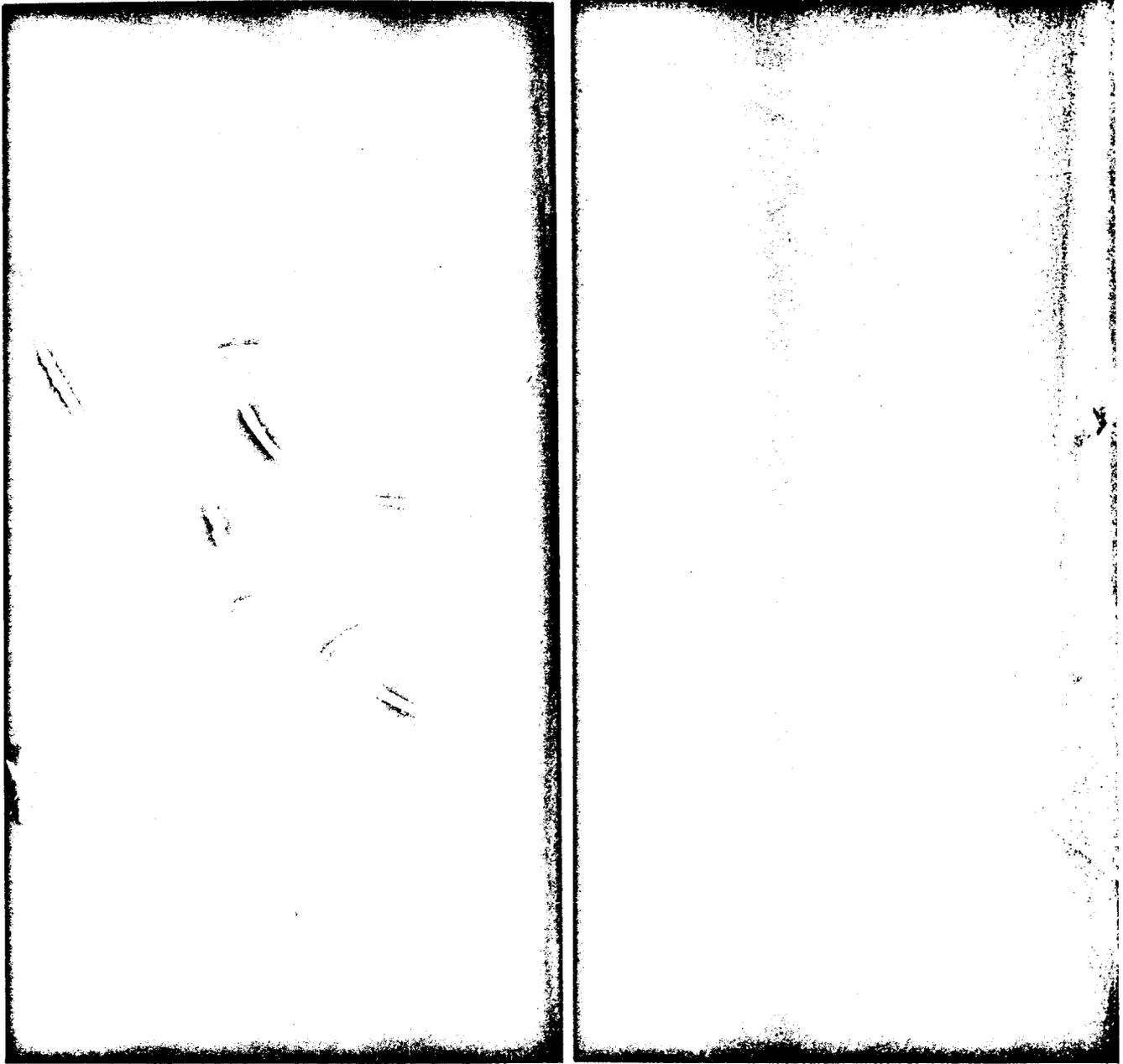


FIGURA 3

D

E

Patrones de fijación de los anticuerpos monoclonales anti  $\alpha$ -tubulina (A), anti  $\beta$ -tubulina (B), anti  $\alpha$ -tubulina + anti  $\beta$ -tubulina (C) y anti actina (D,E), demostrados por inmunofluorescencia indirecta.

(A,C,D) Espermatozoides con acrosoma.

(B,E) Espermatozoides sin acrosoma.

Amplificación 1200 x .

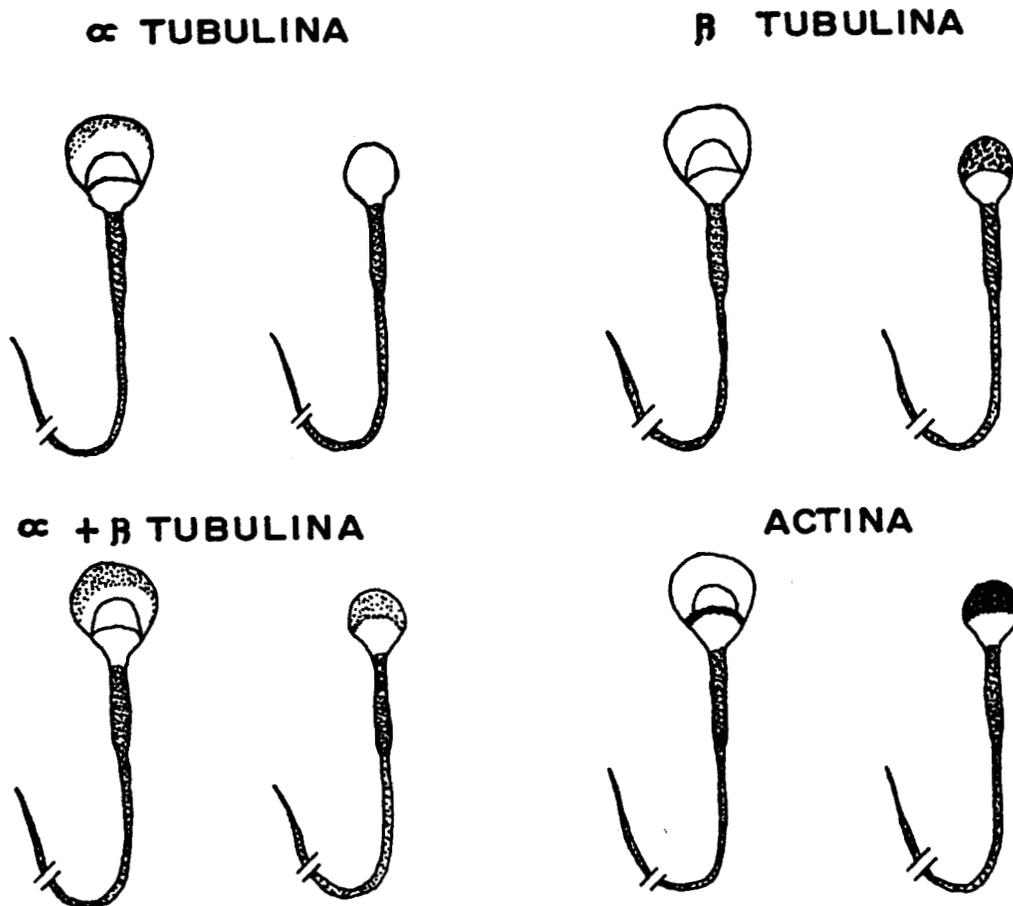


FIGURA 4

Representación esquemática de los patrones de fluorescencia observados al incubar espermatozoides de cobayo en presencia de anticuerpos monoclonales anti  $\alpha$ -tubulina, anti  $\beta$ -tubulina y anti actina, e IgG-Fluoresceína. El esquema se construyó a partir de las imágenes observadas en un microscopio de fluorescencia como se describe en la sección de material y métodos. Los esquemas corresponden a los espermatozoides antes y después de la reacción acrosomal.

090355

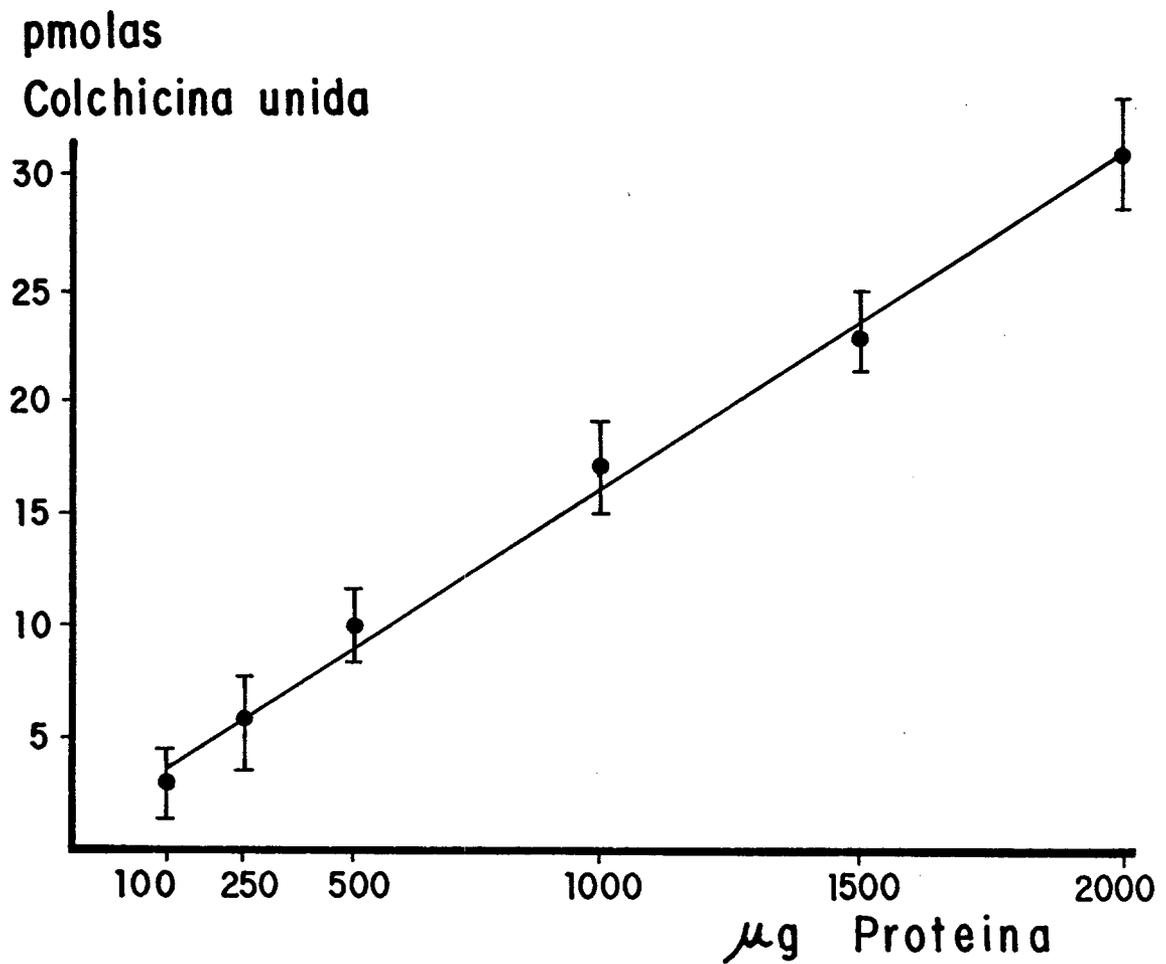


FIGURA 5

Los datos representados en esta gráfica corresponden al promedio  $\pm$  desviación estándar de 5 experimentos, en donde se determinó la fijación de colchicina- $H^3$  a la tubulina presente en la fracción de matriz acrosomal.

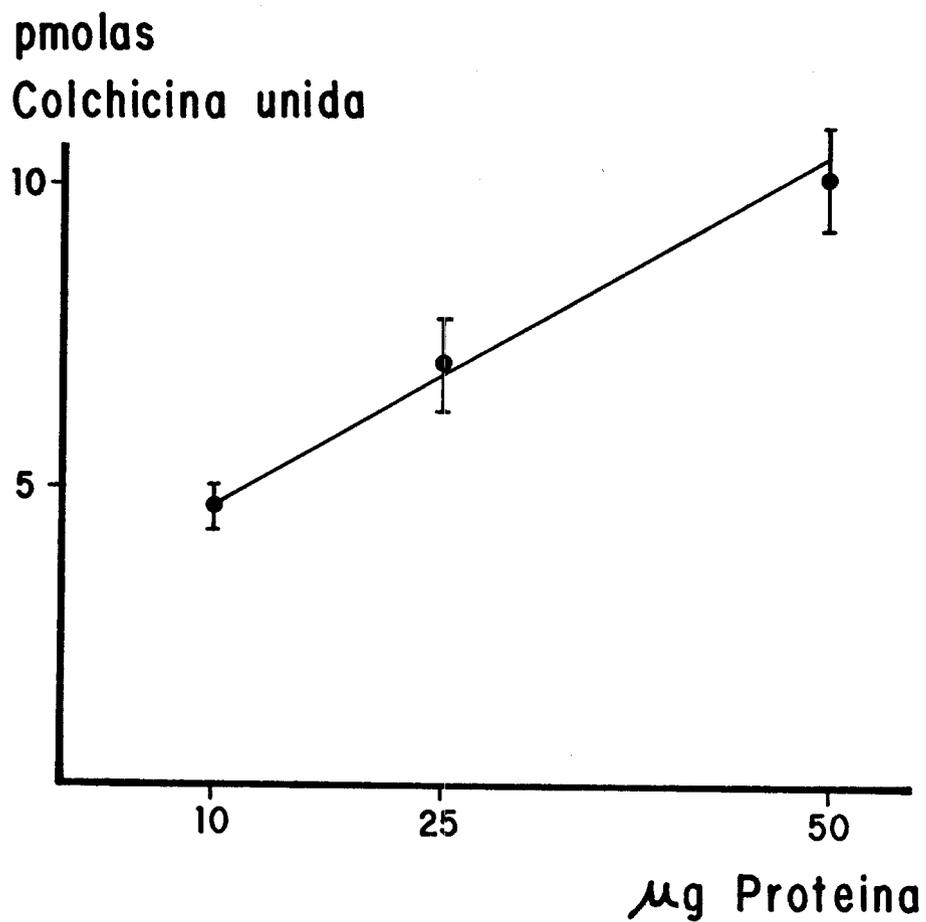


FIGURA 6

Fijación de colchicina- $H^3$  a la tubulina presente en la fracción correspondiente a membranas acrosomales. Los datos representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de 5 experimentos.

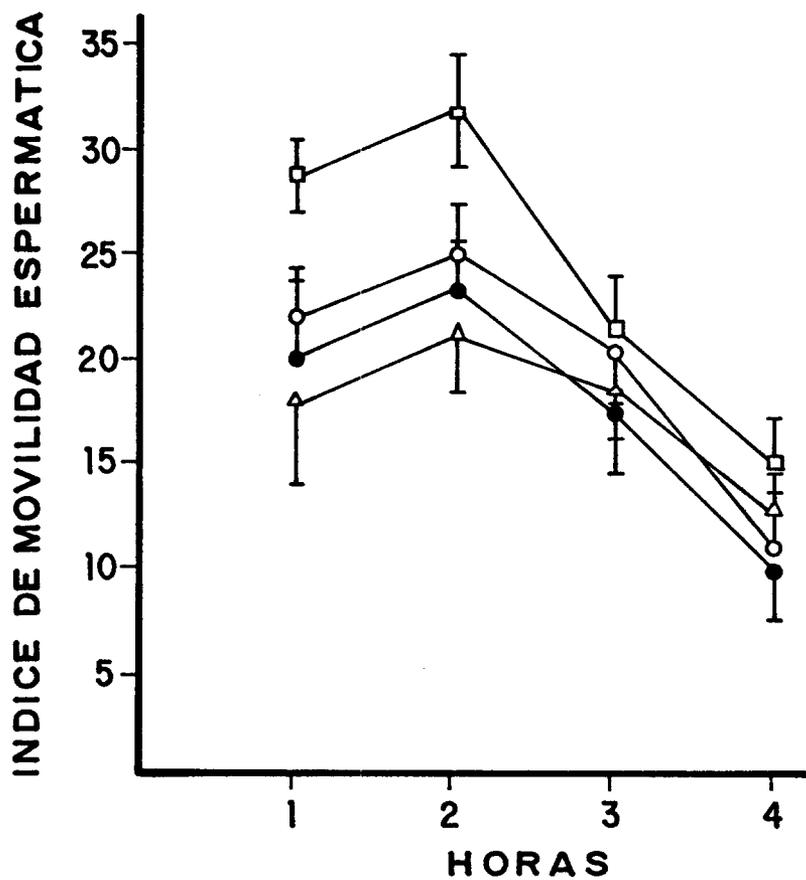


FIGURA 7

Cambios en la movilidad de los espermatozoides de cobayo incubados con Citocalasina B (—○—), Colchicina (—△—) y Vincristina (—□—), todos los compuestos a una concentración de 50  $\mu$ M, así como el control (—●—). Cada punto representa el promedio  $\pm$  desviación estándar de 10 determinaciones.

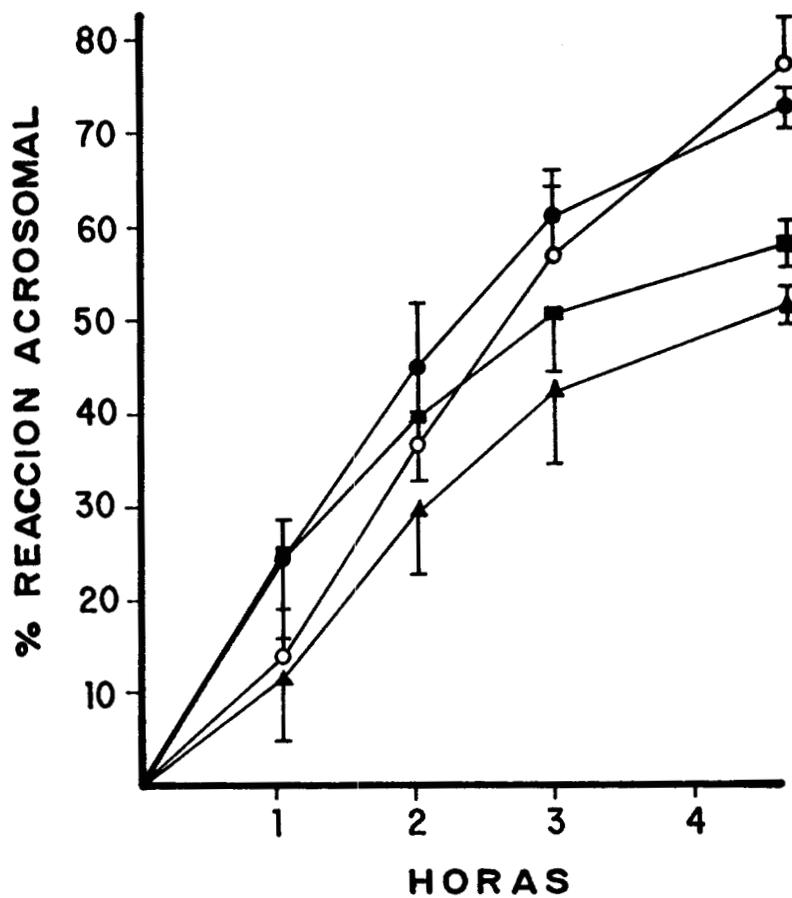


FIGURA 8

Efecto de Citocalasina B sobre la reacción acrosomal de los espermatozoides de cobayo. Las concentraciones utilizadas fueron 10  $\mu\text{M}$  (—●—), 25  $\mu\text{M}$  (—■—) y 50  $\mu\text{M}$  (—▲—), así como el control (—○—). Cada punto representa el promedio  $\pm$  desviación estándar de 5 experimentos.

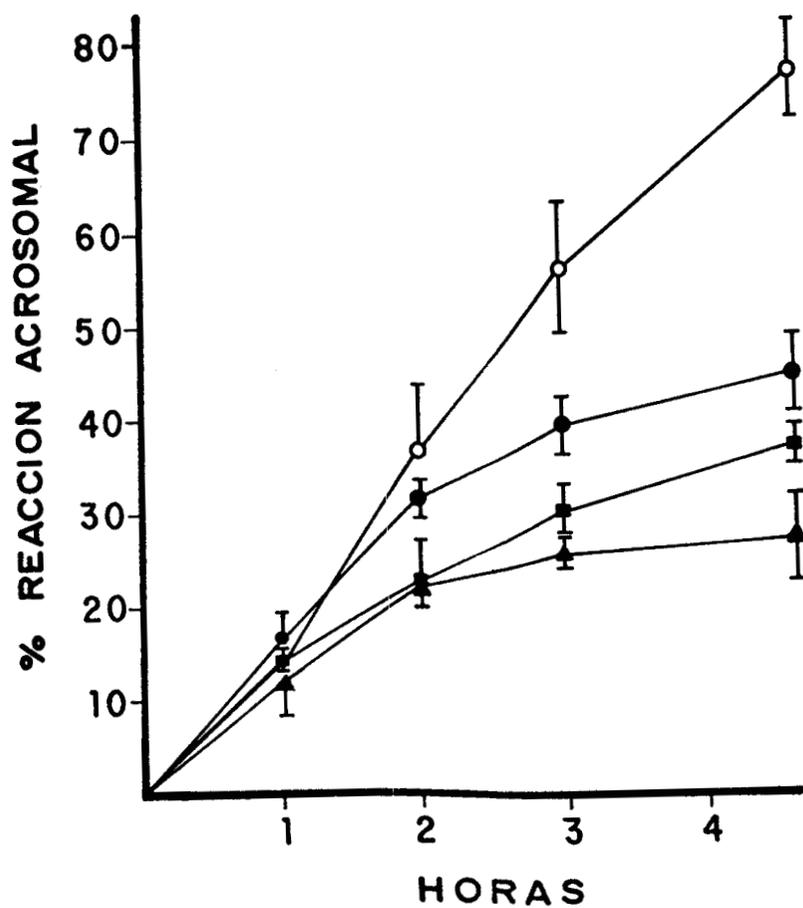


FIGURA 9

Inhibición de la reacción acrosomal en los espermatozoides de cobayo por diferentes concentraciones de Colchicina: 10  $\mu\text{M}$  (—●—), 25  $\mu\text{M}$  (—■—) y 50  $\mu\text{M}$  (—▲—), así como el control (—○—). Cada punto representa el promedio  $\pm$  desviación estándar de 5 experimentos.

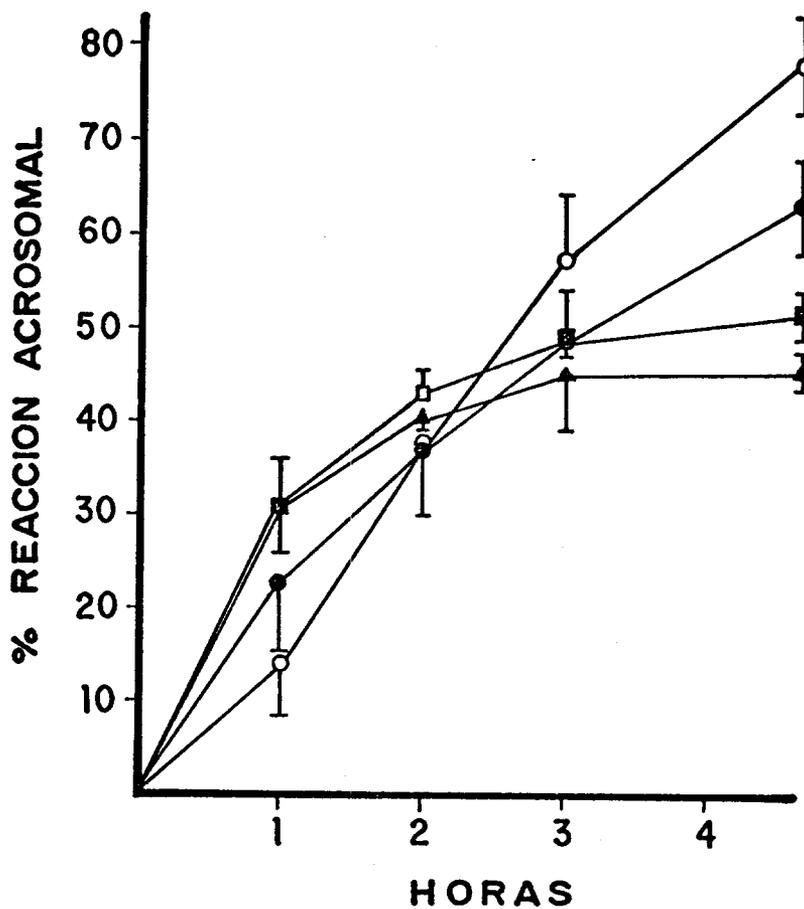


FIGURA 10

Efecto de la Vincristina sobre la reacción acrosomal en los espermatozoides de cobayo. Este alcaloide se utilizó a las siguientes concentraciones: 10  $\mu\text{M}$  (—●—), 25  $\mu\text{M}$  (—■—) y 50  $\mu\text{M}$  (—▲—), así como el control respectivo (—○—). Cada punto representa el promedio  $\pm$  desviación estándar de 5 experimentos.

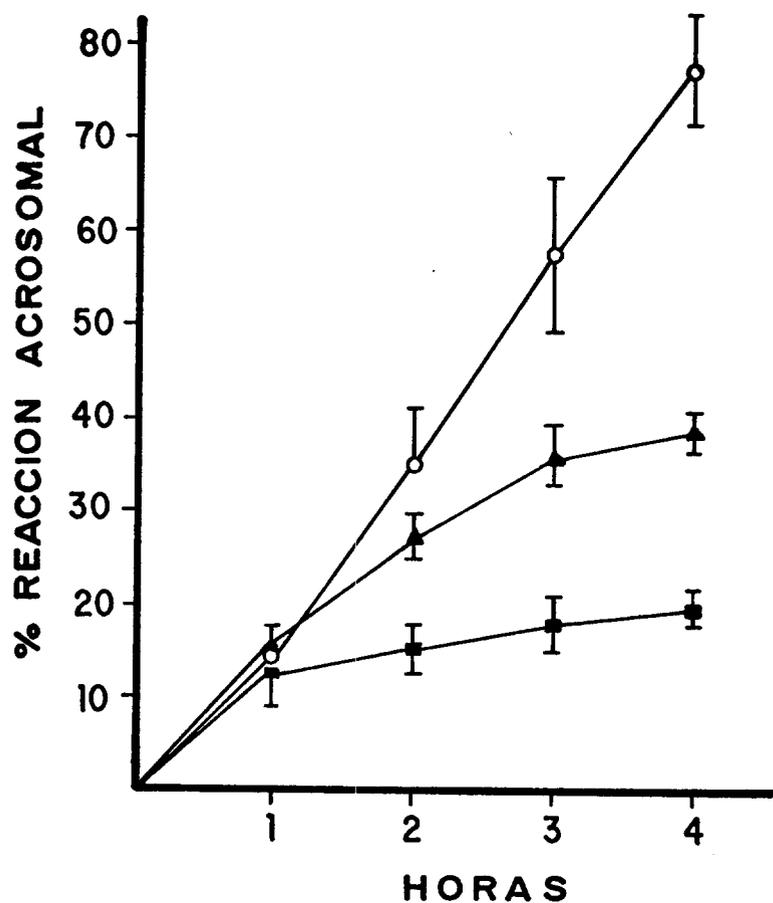


FIGURA 11

Efecto de la incubación simultánea con Citocalasina B y Colchicina sobre la reacción acrosomal en los espermatozoides de cobayo. Las concentraciones utilizadas que están representadas en esta gráfica fueron: Citocalasina B 10  $\mu\text{M}$  + Colchicina 10  $\mu\text{M}$  (—▲—) y Citocalasina B 50  $\mu\text{M}$  + Colchicina 50  $\mu\text{M}$  (—■—), así como el control (—○—). Cada punto representa el promedio  $\pm$  desviación estándar de 5 experimentos.

TABLA 1

	Membranas acrosomales <sup>d</sup>	Matriz acrosomal <sup>d</sup>
PROTEINAS (mg/10 <sup>8</sup> espermatozoides)	0.073 ± 0.008	1.27 ± 0.12
ADN (µg/10 <sup>8</sup> espermatozoides)	No se detectó	No se detectó
ACTIVIDADES ENZIMATICAS		
5'-Nucleotidasa <sup>a</sup>	42.46 ± 1.77	No se detectó
Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPasa <sup>a</sup>	723.39 ± 86.75	No se detectó
Hialuronidasa <sup>b</sup>	264 ± 30	15250 ± 1283
Acrosina <sup>c</sup>	No se detectó	8.5 ± 0.5

<sup>a</sup>nmolas Pi/min/mg de proteína.

<sup>b</sup>Unidades. Una unidad es la cantidad de enzima necesaria para digerir ácido hialurónico en la misma proporción que se obtiene con 1 µg de hialuronidasa estándar purificada (85).

<sup>c</sup>Unidades. Una unidad es la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1µmola del ester etílico de la N-benzoil-L-arginina (BAEE) por minuto (86).

<sup>d</sup>Los datos representan el promedio ± D.E. de 6 determinaciones.

TABLA 2

% DE INHIBICION DE LA REACCION ACROSOMAL EN RELACION AL CONTROL

Concentración	Tiempo de Incubación	Citocalasina B	Colchicina	Vincristina	Citocalasina B + Colchicina
					10 µM + 10 µM
10 µM	1 Hora	0	0	0	0
	2 Horas	0	11%	3%	26%
	3 Horas	0	30% <sup>a</sup>	16% <sup>a</sup>	37% <sup>a</sup>
	4 Horas	8%	42% <sup>b</sup>	19% <sup>a</sup>	51% <sup>c</sup>
25 µM	1 Hora	0	0	0	0
	2 Horas	0	39% <sup>b</sup>	0	0
	3 Horas	11% <sup>a</sup>	46% <sup>b</sup>	18% <sup>a</sup>	0
	4 Horas	26% <sup>b</sup>	52% <sup>c</sup>	34% <sup>b</sup>	50 µM + 50 µM
50 µM	1 Hora	0	12%	0	0
	2 Horas	19% <sup>a</sup>	42% <sup>b</sup>	0	56% <sup>c</sup>
	3 Horas	26% <sup>b</sup>	54% <sup>c</sup>	22% <sup>b</sup>	68% <sup>c</sup>
	4 Horas	34% <sup>c</sup>	65% <sup>c</sup>	42% <sup>c</sup>	75% <sup>c</sup>

<sup>a</sup> P < 0.05 Prueba T de Student.

<sup>b</sup> P < 0.005 Prueba T de Student.

<sup>c</sup> P < 0.0005 Prueba T de Student.

Estos valores se calcularon a partir de los datos obtenidos en 5 experimentos.

TABLA 3

% DE REACCION ACROSOMAL EN ESPERMATOZOIDES DE COBAYO, EN PRESENCIA DE DIFERENTES COMBINACIONES DE CITOCALASINA B Y COLCHICINA

	TIEMPO DE INCUBACION			
	1 Hora	2 Horas	3 Horas	4 Horas
CITOCALASINA B COLCHICINA	14.5 ± 3.3	27.0 ± 2.05 <sup>a</sup>	35.5 ± 2.6 <sup>b</sup>	38.5 ± 1.9 <sup>c</sup>
CITOCALASINA B COLCHICINA	13.5 ± 3.7	16.0 ± 1.8 <sup>c</sup>	18 ± 3.05 <sup>c</sup>	19.5 ± 1.6 <sup>c</sup>
CITOCALASINA B COLCHICINA	16.3 ± 3.3	20.3 ± 2.05 <sup>b</sup>	28.1 ± 2.7 <sup>c</sup>	28.5 ± 1.8 <sup>c</sup>
CITOCALASINA B COLCHICINA	16.0 ± 4.4	30.1 ± 5.1 <sup>a</sup>	41.0 ± 2.05 <sup>a</sup>	47.3 ± 1.6 <sup>b</sup>
CITOCALASINA B COLCHICINA	15.7 ± 8.8	44.3 ± 3.6	60.8 ± 5.7	72.0 ± 1.7 <sup>c</sup>
CITOCALASINA B COLCHICINA	11.8 ± 5.4	29.7 ± 2.9 <sup>a</sup>	37.0 ± 1.05 <sup>b</sup>	51.1 ± 2.1 <sup>b</sup>
COLCHICINA	17.3 ± 3.1	32.4 ± 1.6	39.4 ± 2.9 <sup>a</sup>	45.2 ± 3.6 <sup>c</sup>
COLCHICINA	12.5 ± 3.1	22.2 ± 1.6 <sup>b</sup>	26.1 ± 2.2 <sup>c</sup>	27.2 ± 5.2 <sup>c</sup>
C O N T R O L	13.8 ± 5.4	38.6 ± 7.6	56.8 ± 4.4	78.9 ± 4.2

Los datos representan promedio ± D.E. de 5 determinaciones.

<sup>a</sup>P < 0.05, <sup>b</sup>P < 0.005, <sup>c</sup>P < 0.005 en relación al control. Prueba T de Student.

C A P I T U L O   V

## DISCUSION.

En los espermatozoides de mamífero la reacción acrosomal está considerada como un proceso de secreción que permite la liberación del contenido enzimático de la matriz y membranas acrosomales ( 15 ). La reacción acrosomal es indispensable para que se lleve a cabo la fertilización, ya que en los mamíferos este proceso permite la penetración de los espermatozoides a través de las diferentes capas que recubren al ovocito, es decir, la zona pellucida, el cumulus oophorus y la corona radiata.

Entre las actividades enzimáticas contenidas en el acrosoma se encuentran enzimas hidrolíticas como las proteasas, fosfolipasas y ATPasas. La proteasa asociada con los espermatozoides de mamífero que ha sido mejor caracterizada y estudiada es la enzima parecida a tripsina denominada acrosina. Esta enzima se encuentra como su precursor inactivo proacrosina hasta que es activada durante la reacción acrosomal, sin embargo, su localización en las estructuras acrosomales es controversial ( 15 ), lo cual es debido fundamentalmente a las diferencias de especie.

Stambaugh y Smith reportaron que esta proteasa parece estar firmemente unida a algún componente estructural del acrosoma y describieron una distribución organizada de esta actividad enzimática en los acrosomas de espermatozoides de conejo, mono rhesus y humano (100). Posteriormente estos mismos investigadores reportaron la

presencia de estructuras parecidas a microtúbulos en el acrosoma de espermatozoides de conejo y mono rhesus y sugirieron que estos túbulos participan en la fijación de las proteasas acrosomales (45). Este trabajo fue el primer reporte de la presencia de un sistema de microtúbulos en el acrosoma de los espermatozoides de mamífero.

Casi simultáneamente a este trabajo, Peterson y col. encontraron, utilizando microscopía electrónica e incubación con el ionóforo A23187, que en los espermatozoides eyaculados de cerdo se forman estructuras parecidas a microtúbulos y microfilamentos cuando sucede la reacción acrosomal (46). Ellos reportaron que observaron túbulos en las inmediaciones tanto de la membrana acrosomal externa como de la interna, así como en la región postacrosomal. Estos investigadores localizaron microfilamentos tanto en el área de la vesiculación como en el segmento postecuatorial después de la reacción acrosomal.

De acuerdo con los resultados obtenidos en nuestro trabajo, estas estructuras tubulares corresponden a las formas polimerizadas de la tubulina, ya que mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y anticuerpos monoclonales se localizó la presencia de tubulina en la región acrosomal de los espermatozoides de cobayo..

Estos microtúbulos corresponderían a la clasificación de microtúbulos lábiles, debido a su polimerización solamente en algún momento de la reacción acrosomal y al

efecto observado de colchicina sobre la expresión funcional de estas estructuras.

Esta tubulina parece localizarse preferentemente en las membranas acrosomales, ya que la fijación de colchicina- $H^3$  se llevó a cabo preferentemente en estas estructuras. Así mismo, el hecho de que los patrones de fluorescencia obtenidos con el anticuerpo anti  $\alpha$ -tubulina no varíen en las células permeabilizadas y sin permeabilizar, sugiere que esta proteína se encuentra probablemente asociada con la membrana plasmática y/o la membrana acrosomal externa. La presencia de tubulina membranal ha sido descrita en diferentes tipos de células ( 101 ).

Por otra parte, se localizó también tubulina soluble en la matriz acrosomal, la cual podría polimerizarse formando microtúbulos en las fases iniciales de la reacción acrosomal a semejanza de lo reportado en otros procesos secretorios ( 37 ). Falta todavía determinar la mayor parte de las condiciones fisiológicas o compuestas que regulan la polimerización de estas proteínas en los acrosomas de los espermatozoides de mamífero, siendo la calmodulina y los nucleótidos cíclicos de los candidatos más viables como sucede en otros sistemas de microtúbulos lábiles ( 28 ), debido a su interrelación directa con el calcio, catión divalente que participa en la inducción de la reacción acrosomal en los espermatozoides. Por otra parte, trabajos recientes llevados a cabo en nuestro laboratorio han indicado la presencia de concentraciones importantes de calmodulina tanto en

las membranas acrosomales como en la matriz acrosomal en los espermatozoides de cobayo, así como la participación tanto de AMPc como de GMPc en la regulación de la reacción acrosomal en estas células ( 29 ).

El patrón de distribución de la fluorescencia observado en los espermatozoides con reacción acrosomal indica la presencia de tubulina en la membrana acrosomal interna, como lo reportaron Peterson y col ( 46 ). A pesar de que este patrón de puntilleo observado en este segmento del espermatozoide pudiera corresponder a sitios de implantación de microtúbulos según lo reportado por Stambaugh y Smith para espermatozoides de mono rhesus ( 45 ), es de llamar la atención que este patrón se observó solamente con el anticuerpo monoclonal anti  $\beta$ -tubulina.

La diferencia observada en el patrón de distribución de la  $\alpha$ -tubulina (fluorescencia en los espermatozoides con acrosoma pero no identificable en espermatozoides sin acrosoma) podría explicarse por diferencias en la composición bioquímica de la  $\alpha$ -tubulina antes y después de la reacción acrosomal, ya que se ha demostrado que algunos anticuerpos monoclonales anti  $\alpha$ -tubulina difieren entre ellos en relación a su reactividad a la tubulina aislada de diferentes fuentes ( 102 ). Así mismo, se ha reportado que la subunidad  $\alpha$  de la tubulina presenta un residuo de tirosina en el carboxilo terminal, que está relacionado con la polimerización de la tubulina en microtúbulos ( 103 ); al ensamblarse esta proteína, la  $\alpha$ -tubulina pierde su tirosina terminal y la presen-

cia o ausencia de este residuo influye en la fijación de diferentes anticuerpos monoclonales ( 104 ).

La presencia de actina se ha identificado en numerosas células no musculares, incluyendo los espermatozoides de invertebrados marinos, en donde Tilney y col ( 38-42 ) han aislado y caracterizado la actina acrosomal y han hecho numerosos estudios para elucidar los mecanismos que regulan la polimerización del filamento acrosomal.

En las células no musculares, los filamentos de actina se forman cuando estas células se encuentran cinética o morfológicamente activas. La participación de actina en diversas funciones de los espermatozoides de mamífero ha sido sugerida por varios investigadores que han reportado su presencia en espermatozoide de hamster, perro, conejo, cobayo, ratón, rata, toro, cerdo y humano ( 47,48,49,51,52 ). En todos estos casos, la identificación de esta proteína se ha hecho mediante estudios de inmunofluorescencia utilizando antisueros anti-actina, por lo que existen muchas discrepancias en cuanto a su localización subcelular.

En este trabajo, los resultados de la electroforesis de mostraron que en el acrosoma de los espermatozoides de cobayo, tanto en las membranas como en la matriz acrosomal, existe un polipéptido con el mismo peso molecular que la actina muscular. Estos datos junto con los de Talbot y Kleve ( 49 ) y de Clarke y col ( 48 ) en el espermatozoide de hamster y humano respectivamente, además

de la reacción de los espermatozoides de cobayo con anticuerpo monoclonal anti-actina, son una evidencia importante de que los espermatozoides de mamífero contienen un tipo de actina no muscular. Debe mencionarse que Talbot y Franklin ( 23 ) reportaron que los acrosomas en los espermatozoides de hamster se contraen en una fase inicial de la reacción acrosomal, por lo tanto, ésta podría ser una de las funciones de esta proteína contráctil, entre otras, en el acrosoma.

La microscopía de inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpo monoclonal anti-actina e IgG-Fluoresceína sugiere que la actina está presente en la región acrosomal. Sin embargo, es importante señalar que se localizó en aquellas células que habían llevado a cabo la reacción acrosomal, es decir, en la membrana acrosomal interna.

Por otra parte, a pesar de que el perfil electroforético de las membranas de la región acrosomal (plasmática y acrosomal externa) indicó la presencia de actina, ésta no fue accesible al anticuerpo anti-actina. Es posible que la membrana plasmática y/o la acrosomal externa sean resistentes a los procesos de permeabilización ( 47 ), ya que tanto la actina como la  $\beta$ -tubulina encontradas en la membrana acrosomal interna no pudieron observarse en los espermatozoides intactos, en los que el acrosoma estaba presente, aún en los permeabilizados. En el caso de la actina, es posible también que, como Clarke y Yanagimachi sugirieron para los espermatozoides de rata ( 47 ), esta proteína pudiera estar formando complejos con otras proteínas y sea incapaz de reaccio-

nar con los anticuerpos antes de que se lleve a cabo la reacción acrosomal. Así mismo, es importante señalar que en los trabajos de Talbot y Kleve y de Clarke y col. ( 48,49 ) no fue posible identificar claramente la presencia de actina en los acrosomas utilizando antisueros anti-actina; en otros casos, utilizando espermatozoides intactos de varios mamíferos, no ha sido posible identificar la presencia de esta proteína en el acrosoma (47).

Es importante señalar que a diferencia de lo reportado por diferentes investigadores, no se localizó actina mediante inmunofluorescencia en la región postacrosomal, dato similar a lo encontrado por Flaherty y col. en espermatozoides de ratón ( 51 ); solamente se observó una banda fluorescente localizada en el segmento ecuatorial en los espermatozoides intactos. Esto es importante ya que ésta es una región de fusión membranal durante la reacción acrosomal y se ha sugerido que los microfilamentos participan en este tipo de procesos de fusión en diferentes estirpes celulares ( 72,74 ).

Es posible que estas diferencias en los patrones de distribución de la actina en la cabeza de los espermatozoides estén relacionadas con las diferencias en los tipos de anticuerpos utilizados por los diferentes grupos de investigadores; así mismo, pudieran deberse a que los anticuerpos reaccionen con determinantes antigénicos de la actina que se expongan en diferentes condiciones fisiológicas y/o tratamiento de las células.

Por otra parte, como era de esperarse debido a su constitución ultraestructural, los anticuerpos monoclonales

utilizados identificaron la presencia de proteínas contráctiles (actina y las dos subunidades de la tubulina) en los flagelos de los espermatozoides.

La participación de actina y tubulina en la dinámica de la reacción acrosomal en los espermatozoides se evaluó mediante la incubación de estas células en un sistema capacitante no sincrónico, al que se adicionó citocalasina B, así como colchicina y vincristina, compuestos que interfieren específicamente con el ensamble y función de los microfilamentos y los microtúbulos, respectivamente, en diferentes células eucarióticas (36,99). Se ha propuesto que los efectos de estos compuestos se deben a que interfieren con el equilibrio existente entre las formas soluble y polimerizada de estas proteínas contráctiles y/o a la interferencia con el ensamble de los microfilamentos y los microtúbulos, debido a la formación de complejos actina-citocalasina B y tubulina-colchicina o -vincristina.

Cuando se incubaron los espermatozoides de cobayo con estos compuestos, se encontró una inhibición significativa, dependiente de la dosis, en la reacción acrosomal la cual alcanzó su máxima eficiencia después de 4 horas de incubación cuando en el control había 77-79% de células con reacción acrosomal. Estos resultados pueden considerarse como evidencias de que se interfirió con la función de la tubulina y la actina en la reacción acrosomal, debido a que estos compuestos tienen una selectividad específica.

Es importante el que los resultados obtenidos con vincristina y citocalasina B después de la primera hora de incubación, pudieran deberse posiblemente a un efecto bifásico de estos compuestos en el acrosoma de las células, el cual podría ser similar al efecto reportado de vincristina y citocalasina B en las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans del páncreas durante la secreción de insulina (105,106). Obviamente, esta sugerencia requiere de una mayor investigación para identificar el mecanismo de acción de estos compuestos en el acrosoma de los espermatozoides de mamífero.

Por otra parte, es importante mencionar que se consideró como un pre-requisito en el sistema experimental que los inhibidores, a las concentraciones utilizadas, no interfirieran con la viabilidad y/o con la movilidad celular ya que es importante que las células tuvieran las condiciones metabólicas apropiadas para garantizar la capacidad de llevar a cabo la reacción acrosomal, y que el efecto observado se debiera a la interacción selectiva de los compuestos con la actina y la tubulina presentes en la región acrosomal.

La movilidad en las células tratadas con los inhibidores fue similar a la de las células control, excepto cuando se incubó con el alcaloide vinca en donde se encontró un incremento en la movilidad. Estos resultados permiten señalar que las diferencias observadas entre la sensibilidad de la tubulina acrosomal y la tubulina del flagelo a la colchicina y la vincristina, podría deberse a diferencias en la permeabilidad y propiedades

estructurales de la membrana plasmática en ambas regiones del espermatozoide, las cuales podrían ser inducidas por el proceso de capacitación ( 8,10 ), o bien, podrían reflejar equilibrios intrínsecos diferentes en estas dos poblaciones de microtúbulos ( 53 ).

El incremento transitorio en la concentración de calcio libre en el citosol en respuesta a algún estímulo, regula muchos procesos dependientes de calcio en las células animales ( 107 ). El calcio libre ejerce su efecto al unirse a proteínas de bajo peso molecular como la calmodulina, entre otras ( 107,108 ).

El requerimiento de calcio para que se lleve a cabo la reacción acrosomal en los espermatozoides de mamífero está bien documentado desde el trabajo de Yanagimachi y Usui ( 21 ); sin embargo, se sabe poco acerca de los mecanismos bioquímicos que relacionan a este catión divalente con los eventos celulares subsecuentes. La calmodulina, también en la reacción acrosomal, podría tener un papel modulador ya que se ha establecido que los microfilamentos y los microtúbulos tienen una respuesta diferencial al calcio, en relación a su polimerización y/o despolimerización ( 28 ).

Esta proteína, la calmodulina, podría participar también en la activación de fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos, adenilil ciclase,  $Ca^{++}$ -ATPasa, protein cinasas, etc ( 107,108 ). En los espermatozoides de rata, se ha demostrado la presencia en el acrosoma de fosfodiesterasas dependientes de calcio y moduladas por

calmodulina ( 109 ).

La compleja interrelación entre calmodulina, microtúbulos y microfilamentos en el acrosoma, en relación con la reacción acrosomal es motivo de sugerencia atractiva a determinar, ya que se ha reportado que fármacos anticalmodulina como la trifluoperacina y la clorpromacina inhiben la reacción acrosomal en los espermatozoides de cobayo ( 110 ).

La calmodulina inhibe la polimerización de los microtúbulos *in vitro* en presencia de concentraciones micromolares de calcio y en ausencia de MAPs ( 60,64 ); sin embargo, cuando la concentración de calcio es menor a 1  $\mu$ M o existen MAPs en el sistema el efecto es muy escaso ( 111 ). Esto sugiere que la participación de los microtúbulos en la reacción acrosomal pudiera ser anterior al influjo de calcio. Por otra parte, la polimerización de actina requiere calcio y es favorecida por calmodulina ( 108 ); por lo tanto, esta proteína podría ejercer su efecto simultáneamente y/o posteriormente al influjo de este catión divalente.

Finalmente, Weissmann y col. al estudiar la liberación al medio extracelular de hidrolasas lisosomales por leucocitos estimulados con simógeno o partículas de látex, propuso que este fenómeno está asociado con el ensamble o desensamble transitorio de microtúbulos citoplasmáticos ( 112 ). Ellos propusieron también una hipótesis yin/yang para la modulación de la liberación enzimática, en la cual el GMPc incrementa la secreción enzimática mientras que el AMPc y otros compuestos que inducen el

desensamble de los microtúbulos inhiben la liberación de las enzimas lisosomales ( 112 ).

Es importante mencionar que se ha reportado que el AMPc tiene una participación importante en la inducción y regulación de la capacitación en los espermatozoides de mamífero ( 5,6,113 ) y que la relación GMPc/AMPc modula la reacción acrosomal en los espermatozoides de hamster y de cobayo ( 34,35 ); así mismo, se ha demostrado que las membranas espermáticas poseen receptores específicos para AMPc ( 13 ) y Reyes y col encontraron que las concentraciones de AMPc y GMPc en las secreciones de útero y oviducto en la coneja se modifican en función de tiempo después de la cópula ( 5 ). La relación GMPc/AMPc en el fluido de trompa de fallopio alcanza su valor más alto 6 horas después de la cópula y este hecho coincide de manera interesante con las etapas finales del proceso de capacitación, por lo tanto con el proceso de la reacción acrosomal, en este mamífero.

Estos datos además del hecho de que se ha postulado una relación estructural y funcional muy cercana entre el acrosoma en los espermatozoides de mamífero y los lisosomas, así como los resultados presentados en este trabajo, apoyan la hipótesis presentada de que en la dinámica de la reacción acrosomal en los espermatozoides de mamífero, la actina y la tubulina tienen un papel importante como sucede en otros sistemas secretorios. Este fenómeno podría estar modulado por una relación precisa de nucleótidos cíclicos y los cambios en la concentración de calcio, a través del ensamble-desensamble de microtúbulos y microfilamentos en la región acrosomal, de acuerdo con los requerimientos fisiológicos de las células.

C A P I T U L O   V I

## CONCLUSIONES.

Debido a la relación estructural y funcional que existe entre el acrosoma en los espermatozoides de mamífero y otros sistemas secretores en diferentes estirpes celulares, en donde el ensamble y desensamble de microtúbulos y microfilamentos regula la exocitosis, se consideró necesario determinar cualitativa y cuantitativamente la presencia de proteínas contráctiles como tubulina y actina en el acrosoma (membrana y matriz acrosomales) de los espermatozoides de mamífero, en este caso cobayo y se propuso que éstas se ensamblarían durante la reacción acrosomal para formar microtúbulos y microfilamentos.

En este estudio se demostró mediante electroforesis vertical en geles de poliacrilamida-SDS e inmunofluorescencia indirecta la presencia de proteínas cuyas características bioquímicas coinciden con las conocidas para actina y tubulina, tanto en la fracción membranal del acrosoma como en la matriz acrosomal. Además, se encontró que los inhibidores para microfilamentos y microtúbulos citocalasina B, colchicina y vincristina interfieren con la reacción acrosomal inducida por calcio y debido a sus mecanismos de acción en relación a los microfilamentos y microtúbulos es posible sugerir la participación de estas proteínas contráctiles en la reacción acrosomal.

Por otra parte, debido a los mecanismos que regulan la

polimerización de actina y tubulina es posible que su acción sea secuencial, es decir, tubulina antes del influjo de calcio y actina simultáneamente o posteriormente a este evento, aspecto también motivo de investigación.

De acuerdo a los mecanismos moleculares propuestos para la reacción acrosomal, la formación y funcionamiento de estos organelos parecen estar regulados a su vez a través del efecto de calmodulina y los cambios en las concentraciones endógenas y exógenas de calcio y nucleótidos cíclicos, como respuesta a primeros mensajeros específicos y teniendo como resultado la activación y secreción de las enzimas acrosomales.

Por lo tanto, la presencia de proteínas contráctiles en el acrosoma de los espermatozoides de cobayo y su participación en la reacción acrosomal apoyan la hipótesis propuesta de que la reacción acrosomal en los espermatozoides de mamífero parece tener características en común con un proceso de secreción.

A este estudio deberán seguir las estrategias para conocer los mecanismos moleculares que regulan el ensamble de estas estructuras, así como también determinar su localización subcelular en el acrosoma.

C A P I T U L O   V I I

## BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Coutinho E.M.- Interference with ovum transport: Implications for fertility control. En: Ovum Transport and Fertility Regulation. WHO Symposium, San Antonio, Texas, 1975. Harper M.J.K., Pauerstein C. J., Adams C.E. (Eds.). Scriptor, Copenhagen, 1976. Págs. 544-556.
- 2.- Meizel S.- The mammalian sperm acrosome reaction. A biochemical approach. En: Development in Mammals. Johnson M.H. (Ed.). North Holland Press, Amsterdam, 1978. Vol. 3:1-64.
- 3.- Chang M.C., Austin C.R., Bedford J.M., Brackett B.G., Hunter R.H.F., Yanagimachi R.- Capacitation of spermatozoa and fertilization in mammals. En: Frontiers in Reproduction and Fertility Control. Greep R.O., Koblinsky M.A. (Eds.). MIT Press, Boston, 1977. Págs. 434-445.
- 4.- Yanagimachi R.- Mechanisms of fertilization in mammals. En: Fertilization and Embryonic Development In Vitro. Mastroianni L. Jr., Biggers J.D. (Eds.). Plenum Press, New York, 1981. Págs. 81-182.
- 5.- Reyes A., Chavarría M.E., Rosado A.- Interference with spermatozoa capacitation. En: Clinics in Andrology, Vol. 5:Regulation of Male Fertility. Cunningham G.R., Schill W.B., Hafez E.S.E. (Eds.). Martinus Nihjoff Pub., The Hague. Págs. 132-146.
- 6.- Rosado A., Hicks J.J., Reyes A., Blanco I.- Capacitation *in vitro* of rabbit spermatozoa with cyclic adenosine monophosphate and human follicular fluid. Fertil Steril 25:821-824, 1974.

- 7.- Hicks J.J., Pedrón N., Rosado A.- Modifications of human spermatozoa glycolysis by cyclic adenosine monophosphate (cAMP), estrogens and follicular fluid. *Fertil Steril* 23:886-893, 1972.
- 8.- Friend D.S., Orci L., Perrelet A., Yanagimachi R.- Membrana particle changes attending the acrosome reaction in guinea pig spermatozoa. *J Cell Biol* 74:561-577, 1977.
- 9.- Hernández-Jáuregui P., Sosa A., González-Angulo A., Rosado A.- The glycocalyx in human spermatozoa: A cytochemical study. En: *Electron Microscopic Events of Secretion. Ultrastructure of Endocrinal and Reproductive Organs.* Hess M. (Ed.). John Wiley & Sons, New York, 1975. Págs. 223-230.
- 10.- Delgado N.M., Huacuja L., Pancardo R.M., Merchant H., Rosado A.- Changes in the protein conformation of human spermatozoal membranes after treatment with cyclic adenosine 3'-5'-monophosphate and human follicular fluid. *Fertil Steril* 27:413-420, 1976.
- 11.- Huacuja L., Delgado N.M., Merchant H., Pancardo R.M., Rosado A.- Cyclic AMP induced incorporation of  $^{33}\text{Pi}$  into human spermatozoa membrane components. *Biol Reprod* 17:89-96, 1977.
- 12.- Reyes A., Mercado E., Rosado A.- Inhibition of capacitation and of the fertilizing capacity of rabbit spermatozoa by blocking membrane sulfhydryl groups. En: *Recent Advances in Human Reproduction.* Campos da Paz A., Drill V.A., Hayashi M., Rodriguez W., Schally A.V. (Eds.). Excerpta Medica, Amsterdam, 1975. Págs. 322-324.

- 13.- Rosado A., Huacuja L., Delgado N.M., Hicks J.J., Pancardo R.M.- Cyclic-AMP receptors in the human spermatozoa membrane. *Life Sci* 17:1707-1714, 1975.
- 14.- Hernández-Pérez O., Ballesteros L.M., Rosado A.- Binding of 17- $\beta$ -estradiol to the outer surface and nucleus of human spermatozoa. *Arch Androl* 3:23-29, 1979.
- 15.- Meizel S.- The importance of hydrolytic enzymes to an exocytotic event, the mammalian sperm acrosome reaction. *Biol Rev* 59:125-157, 1984.
- 16.- Reyes A., Oliphant G., Brackett B.G.- Partial purification and identification of a reversible decapacitation factor from rabbit seminal plasma. *Fertil Steril* 26:148-157, 1975.
- 17.- O'Rand M.G.- Restriction of a sperm surface antigen's mobility during capacitation. *Develop Biol* 55:260-270, 1977.
- 18.- Mercado E., Hicks J.J., Drago C., Rosado A.- A study of the interaction of human spermatozoa membrane with ATP and cyclic-AMP. *Biochem Biophys Res Commun* 56:185-192, 1974.
- 19.- Tilney L.G., Hatano S., Ishikawa H., Mooseker M.- The polymerization of actin: its role in the generation of the acrosomal process of certain echinoderm sperm. *J Cell Biol* 59:109-126, 1973.
- 20.- Bedford J.M., Cooper G.W.- Membrane fusion events in the fertilization of vertebrate eggs. *En: Cell Surface Reviews*. Poste G., Nicolson G.L. (Eds.). Elsevier-North Holland Pub., Amsterdam, 1978. Vol. 5:65-125.

- 21.- Yanagimachi R., Usui N.- Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. *Exptl Cell Res* 89:161-174, 1974.
- 22.- Rogers B.J.- Mammalian sperm capacitation and fertilization *in vitro*: A critique of methodology. *Gamete Res* 1:165-223, 1978.
- 23.- Talbot P., Franklin L.E.- Morphology and kinetics of the hamster sperm acrosome reaction. *J Exp Zool* 198:163-176, 1976.
- 24.- Reyes R., Carranco A., Merchant H., Hernández O., Rosado A., Delgado N.M.- Glycosamineglycan-sulphate as acrosomal reaction inducing factor of follicular fluid. *Arch Androl*, 1984, en prensa.
- 25.- Summers R.G., Talbot P., Keough E.M., Hylander B.L., Franklin L.E.- Ionophore A23187 induces acrosome reactions in sea urchin and guinea pig spermatozoa. *J Exp Zool* 196: 381-385, 1976.
- 26.- Talbot P., Summers R.G., Hylander B.L., Keough E.M., Franklin L.E.- The role of calcium in the acrosome reaction: An analysis using ionophore A23187. *J Exp Zool* 198:383-392, 1976.
- 27.- Singh J.P., Babcock D.F., Lardy H.A.- Increased calcium ion influx is a component of capacitation of spermatozoa. *Biochem J* 172:549-556, 1978.
- 28.- Dedman J.R., Brinkley B.R., Means A.R.- Regulation of microfilaments and microtubules by calcium and cyclic AMP. En: *Advances in Cyclic Nucleotide research*. Greengard P., Robinson G.A. (Eds.). Raven Press, New York, 1979. Vol 11:131-174.

- 29.- Chavarría M.E., Reyes A.- Observaciones no publicadas.
- 30.- Meizel S., Lui C.W.- Evidence for the role of a trypsin-like enzyme in the hamster sperm acrosome reaction. *J Exp Zool* 195:137-144, 1976.
- 31.- Santos-Sacchi J., Gordon M., Williams W.L.- Potentiation of the cGMP-induced guinea pig acrosome reaction by zinc. *J Exp Zool* 213:289-291, 1980.
- 32.- Rogers B.J., Yanagimachi R.- Retardation of guinea pig sperm acrosome reaction by glucose: The possible importance of pyruvate and lactate metabolism in capacitation and the acrosome reaction. *Biol Reprod* 13:568-575, 1975.
- 33.- Meizel S., Working P.K.- Further evidence suggesting the hormonal stimulation of hamster sperm acrosome reactions by catecholamines *in vitro*. *Biol Reprod* 22:211-216, 1980.
- 34.- Rogers B.J., García L.- Effect of cAMP on acrosome reaction and fertilization. *Biol Reprod* 21:365-372, 1979.
- 35.- Mrsny R.J., Meizel S.- Evidence suggesting a role for cyclic nucleotides in acrosome reactions of hamster sperm *in vitro*. *J Exp Zool* 211:153-157, 1980.
- 36.- Wilson L., Bamburg J.R., Mizel S.B., Grisham L.M., Creswell K.M.- Interaction of drugs with microtubule proteins. *Fed Proc* 33:158-166, 1974.
- 37.- Poisner A.M., Trifaró J.M. (Eds).- *The Secretory Granule*. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam. 1982.

- 38.- Tilney L.G.- Actin filaments in the acrosomal reaction of *Limulus* sperm. Motion generated by alterations in the packing of the filaments. *J Cell Biol* 64:289-310, 1975.
- 39.- Tilney L.G., Kiehart D., Sardet C., Tilney M.- Polymerization of actin. IV. The role of  $Ca^{++}$  and  $H^+$  in the assembly of actin and in membrane fusion in the acrosomal reaction of echinoderm sperm. *J Cell Biol* 77:536-550, 1978.
- 40.- Tilney L.G.- Polymerization of actin. V. A new organelle, the actomere, that initiates the assembly of actin filaments in *Thyone* sperm. *J Cell Biol* 77:551-564, 1978.
- 41.- Tilney L.G., Inoué S.- Acrosomal reaction of *Thyone* sperm. II. The kinetics and possible mechanism of acrosomal process elongation. *J Cell Biol* 93:820-827, 1982.
- 42.- Tilney L.G., Bonder E.M., Coluccio L.M., Mooseker M.S.- Actin from *Thyone* sperm assembles on only one end of an actin filament: A behavior regulated by profilin. *J Cell Biol* 97:112-124, 1983.
- 43.- Tandler B., Moriber L.G.- Microtubular structures associated with the acrosome during spermiogenesis in the water-strider, *Gerris remigis*. *J Ultrastruc Res* 14:391-404, 1966.
- 44.- Walker M., McGregor H.C.- Spermatogenesis and the structure of the mature sperm in *Nucella lapillus*. *J Cell Sci* 3:95-104, 1967.

- 45.- Stambaugh R., Smith M.- Tubulin and microtubule-like structures in mammalian acrosomes. J Exp Zool 203:135-141, 1978.
- 46.- Peterson R., Russell L., Bundman D., Freund M.- Presence of microfilaments and tubular structures in boar spermatozoa after chemically inducing the acrosome reaction. Biol Reprod 19:459-466, 1978.
- 47.- Clarke G.N., Yanagimachi R.- Actin in mammalian sperm heads. J Exp Zool 205:125-132, 1978.
- 48.- Clarke G.N., Clarke F.M., Wilson S.- Actin in human spermatozoa. Biol Reprod 26:319-327, 1982.
- 49.- Talbot P., Kleve M.G.- Hamster sperm cross react with antiactin. J Exp Zool 204: 131-136, 1978.
- 50.- Campanella C., Gabbiani G., Baccetti B., Burrini A. G., Pallini V.- Actin and myosin in the vertebrate acrosomal region. J Submicrosc Cytol 11:53-71, 1979.
- 51.- Flaherty S.P., Breed W.G., Sarafis V.- Localization of actin in the sperm head of the plains mouse *Pseudomys australis*. J Exp Zool 225:497-500, 1983.
- 52.- Tamblyn T.M.- Identification of actin in boar epididymal spermatozoa. Biol Reprod 22:727-734, 1980.
- 53.- Snyder J.A., McIntosh J.R.- Biochemistry and physiology of microtubules. Ann Rev Biochem 45:599-720, 1976.
- 54.- Bryan J.- Biochemical properties of microtubules. Fed Proc 33:152-157, 1974.

- 55.- Valenzuela P.- Quiroga M., Zaldivar J., Rutter W.J., Kirschner M.W., Cleveland D.W.- Nucleotide and corresponding amino acid sequences encoded by  $\alpha$  and  $\beta$  tubulin mRNAs. *Nature* 289:650-655, 1981.
- 56.- Karr T.L., Podrasky A.E., Purich D.L.- Participation of guanine nucleotides in nucleation and elongation steps of microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:5475-5479, 1979.
- 57.- Ventilla M., Cantor C.R., Shelanski M.- A circular dichroism study of microtubule protein. *Biochemistry* 11:1554-1561, 1972.
- 58.- Olmsted J.B., Borisi G.G.- Ionic and nucleotide requirements for microtubule polymerization *in vitro*. *Biochemistry* 14:2996-3005, 1975.
- 59.- Berkowitz S.A., Wolff J.- Intrinsic calcium sensitivity of tubulin polymerization. *J Biol Chem* 256:11216-11223, 1981.
- 60.- Deery W.J., Means A.R., Brinkley B.R.- Calmodulin-microtubule association in cultured mammalian cells. *J Cell Biol* 98:904-910, 1984.
- 61.- Bhattacharyya B., Wolff J.- Tubulin aggregation and disaggregation: Mediation by two distinct vinblastine-binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 73:2375-2378, 1976.
- 62.- Bryan J.- Vinblastine and microtubules. I. Induction and isolation of crystals from sea urchin oocytes. *Exptl Cell Res* 66:129-136, 1971.
- 63.- Calissano P., Cozzari C.- Interaction of nerve growth factor with the mouse-brain neurotubule protein(s). *Proc Natl Acad Sci USA* 71:2131-2135, 1974.

- 64.- Nunez J., Francon J., Lennon A.M., Fellous A., Mareck A.- The role of MAPs in microtubule assembly. En: Microtubules and Microtubule Inhibitors 1980. DeBrabander M., DeMey J. (Eds.). Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1980. Págs. 213-225.
- 65.- Gaskin F., Shelanski M.L.- Microtubules and intermediate filaments. En: Essays in Biochemistry. Campbell P.N., Aldridge W.N. (Eds.). Academic Press, London, 1976. Vol 12:115-146.
- 66.- Lee J.C., Timasheff S.N.- *In vitro* reconstitution of calf brain microtubules. Effects of solution variables. Biochemistry 16:1754-1764, 1977.
- 67.- Eagle G.R., Zombola R.R., Himes R.H.- Tubulin-zinc interactions: Binding and polymerization studies. Biochemistry 22:221-228, 1983.
- 68.- Sloboda R.D., Rudolph S.A., Rosenbaum J.L., Greengard P.- Cyclic AMP dependent endogenous phosphorylation of a microtubule-associated protein. Proc Natl Acad Sci USA 72:177-181, 1975.
- 69.- Witman G.B., Cleveland D.W., Weingarten M.D., Kirschner M.W.- Tubulin requires  $\tau$  for growth onto microtubule initiating sites. Proc Natl Acad Sci USA 73: 4070-4074, 1975.
- 70.- Mannherz H.G., Goody R.S.- Proteins of contractile systems. Ann Rev Biochem 45:427-465, 1976.
- 71.- Hitchcock S.E.- Regulation of motility in nonmuscle cells (a review). J Cell Biol 74:1-15, 1977.

- 72.- Pollard T.D.- Cytoplasmic contractile proteins. J Cell Biol 91:156s-165s, 1981.
- 73.- Vandekerckhove J., Weber K.- The amino acid sequence of *Physarum* actin. Nature 276:720-721, 1978.
- 74.- Hatano S., Oosawa F.- Cell motility and the organization of actin and myosin in non-muscle cells. En: Cell Motility: Molecules and Organization. Hatano S., Ishikawa H., Sato H. (Eds.). University Park Press, Baltimore, 1979. Págs. 675-683.
- 75.- Stossel T.P., Hartwig J.H., Yin H.L., Davies W.A.- Actin-binding proteins. En: Cell Motility: Molecules and Organization. Hatano S., Ishikawa H., Sato H. (Eds.). University Park Press, Baltimore, 1979. Págs. 189-209.
- 76.- Davies P., Bechtel P., Pastan I.- Filamin inhibits actin activation of heavy meromyosin ATPase. FEBS Lett 77:228-232, 1977.
- 77.- Lazarides E.- Actin,  $\alpha$ -actinin and tropomyosin interaction in the structural organization of actin filaments in non-muscle cells. J Cell Biol 68:202-219, 1976.
- 78.- Coluccio L.M., Tilney L.G.- Under physiological conditions actin disassembles slowly from the non-preferred end of an actin filament. J Cell Biol 97:1629-1634, 1983.
- 79.- Woodrum D.T., Rich S.A., Pollard T.D.- Evidence for biased bidirectional polymerization of actin filaments using heavy meromyosin prepared by an improved method. J Cell Biol 67:231-237, 1975.

- 80.- Wegner A.- Head to tail polymerization of actin. J Mol Biol 108:139-150, 1976.
- 81.- Wegner A., Neuhaus J.M.- Requirement of divalent cations for fast exchange of actin monomers and actin filament subunits. J Mol Biol 153:681-693, 1981.
- 82.- Paulson J.D., Polakoski K.L.- Preparation of human semen by glass wool columns. En: Techniques of Human Andrology. Hafez E.S.E. (Ed.). North Holland Pub. Co., Amsterdam, 1977. Págs. 445-446.
- 83.- Barros C.- Capacitation of mammalian spermatozoa. En: Physiology and Genetics of Reproduction, parte B. Coutinho E.M., Fuchs F. (Eds.). Plenum Pub. Co., New York, 1974. Págs. 3-24.
- 84.- Beaufay H., Amar-Costesec A., Faytmans E., Thines-Sempoux D., Wilbon M., Robbi M., Berthet J.- Analytical study of microsomes and isolated subcellular membranes from rat liver. I. Biochemical methods. J Cell Biol 61:188-200, 1974.
- 85.- Dorfman A., Ott M.L.- A turbidimetric method for the assay of hyaluronidase. J Biol Chem 172:367-375, 1948.
- 86.- Schleuning W.D., Fritz H.- Sperm acrosin. Meth Enzymol 19:330-342, 1976.
- 87.- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A., Randall R.- Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 193:265-275, 1951.
- 88.- Giles K.W., Myers A.- An improved DPA method for the estimation of DNA. Nature 206:93, 1965.

- 89.- Laemmli U.K.- Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685, 1970.
- 90.- Berkowitz S.A., Katagiri J., Binder H.K., Williams R.C.- Separation and characterization of microtubule proteins from calf brain. Biochemistry 16:5610-5617, 1977.
- 91.- Gressel J., Wolowelsky J.- A spectrophotometer attachment for scanning polyacrylamide gels. Anal Biochem 24:157-161, 1968.
- 92.- Kilmartin J.V., Wright B., Milstein C.- Rat monoclonal antitubulin antibodies derived by using a new nonsecreting rat cell line. J Cell Biol 93:576-582, 1982.
- 93.- Gozes I., Barnstable C.J.- Monoclonal antibodies that recognize discrete forms of tubulin. Proc Natl Acad Sci USA 79:2579,2583, 1982.
- 94.- Fagraeus A., Orvell C., Norberg R., Norrby E.- Monoclonal antibodies to epitopes shared by actin and vimentin obtained by paramyxovirus immunization. Exptl Cell Res 145:425-432, 1983.
- 95.- Sherline P., Bodwin C.K., Kipnis D.M.- A new colchicine binding assay for tubulin. Anal Biochem 62:400-407, 1974.
- 96.- Talbot P., Chacon R.S.- A triple-stain technique for evaluating normal acrosomal reactions of human sperm. J Exp Zool 215:201-208, 1981.
- 97.- Atherton R.W., Rodany E.W., Polakoski K.L.- Spectrophotometric quantitation of mammalian spermatozoan motility.I. Human. Biol Reprod 18:624-628, 1978.

- 98.- Timourian H., Watchmaker G.- Determination of spermatozoan motility. *Dev Biol* 21:62-72, 1970.
- 99.- Tannenbaum J.- Approaches to the molecular biology of cytochalasin action. En: *Cytochalasins, Biochemical and Cell Biological Aspects*. Tanenbaun S.W. (Ed.). North Holland Pub. Co., Amsterdam, 1978. *Frontiers of Biology* vol. 46:521-559.
- 100.- Stambaugh R., Smith M.- An organized distribution of acrosomal proteinase in rabbit sperm acrosomes. *J Exp Zool* 193:119-122, 1975.
- 101.- Murray J.M.- Three-dimensional structure of a membrane-microtubule complex. *J Cell Biol* 98:283-295, 1983.
- 102.- Asai D.J., Brokaw C.J., Thompson W.C., Wilson L.- Two different monoclonal antibodies to alpha-tubulin inhibit the bending of reactivated sea urchin spermatozoa. *Cell Motil* 2:599-614, 1982.
- 103.- Thompson W.C., Deanin G.G., Gordon M.W.- Intact microtubules are required for rapid turnover of carboxyl-terminal tyrosine of  $\alpha$ -tubulin in cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:1318-1322, 1979.
- 104.- Thompson W.C., Asai D.J., Carney D.H.- Heterogeneity among microtubules of the cytoplasmic microtubule complex detected by a monoclonal antibody to alpha tubulin. *J Cell Biol* 98:1017-1025, 1984.
- 105.- Lacy P.E., Klein N.J., Fink C.J.- Effect of cytochalasin B on the biphasic release of insulin in perifused rat islets. *Endocrinology* 92:1458-1468, 1973.

- 106.- Lacy P.E., Walker M.M., Fink C.J..- Perifusion of isolated rat islets *in vitro*: Participation of the microtubular system in the biphasic release of insulin. *Diabetes* 21:987-998, 1972.
- 107.- Cheung W.Y..- Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. *Science* 207:19-27, 1980.
- 108.- Means A.R., Tash J.S., Chafouleas J.M..- Physiological implications of the presence, distribution, and regulation of calmodulin in eukaryotic cells. *Physiol Rev* 62:1-39, 1982.
- 109.- Wasco W.M., Orr G.A..- Function of calmodulin in mammalian sperm: Presence of a calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase associated with demembranated rat caudal epididymal sperm. *Biochem Biophys Res Commun* 118:636-642, 1984.
- 110.- Lenz R.W., Cormier M.J..- Effects of calmodulin-binding drugs on the guinea pig spermatozoon acrosome reaction and the use of these drugs as vaginal contraceptive agents in rabbits. *Ann NY Acad Sci* 383:85-97, 1982.
- 111.- Marcum J.M..- Dedman J.R., Brinkley B.R., Means A.R..- Control of microtubule assembly-disassembly by calcium-dependent regulator protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:3771-1775, 1978.
- 112.- Weissmann G., Goldstein I., Hoffstein S., Chauvet G., Robineaux R..- Yin/Yang modulation of lysosomal enzyme release from polymorphonuclear leukocytes by cyclic nucleotides. *Ann NY Acad Sci* 256:222-232, 1975.

113.- Garbers D.L., Kopf G.S.,.- The regulation of spermatzoa by calcium and cyclic nucleotides. En: Advances in Cyclic Nucleotide Research. Greengard P., Robinson G.A. (Eds.). Raven Press, New York, 1980. Vol. 13:251-291.



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

SUBDIRECCION GENERAL MEDICA  
JEFATURA DE LOS SERVICIOS DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION  
SUBJEFATURA DE INVESTIGACION

DEPARTAMENTO DE  
INVESTIGACION  
BIOMEDICA

México, D. F., 26 de julio de 1984

Dr. Héctor González Cerezo  
Coordinador de la Maestría  
de Biología de la Reproducción  
Animal, U.A.M. Iztapalapa  
Presente

Me es grato comunicar a usted que la Q.F.B. María Eugenia Chavarría Olarte con número de matrícula 79358193 ha concluido tanto el Curriculum de la maestría que usted coordina así como también su trabajo de tesis titulado: Evaluación Bioquímica de la Presencia y Participación de Actina y Tubulina en la Reacción Acrosomal de los Espermatozoides de Cobayo para obtener el grado de Maestro en Ciencias.

Este estudio realizado bajo mi dirección y de acuerdo con mi criterio cumple con los requisitos que están indicados en el Reglamento de Estudios de Posgrado de la Universidad Autónoma Metropolitana.

Atentamente

  
Dr. Alejandro Reyes Fuentes  
Jefe de la División  
de Bioquímica