

70196

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA - IZTAPALAPA

DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD

U. A. M. IZTAPALAPA BIBLIOTECA

TITULO:

/"PARTICIPACION DE NUCLEOTIDOS CICLICOS EN LA REAC-  
CION ACROSOMAL DEL ESPERMATOZOIDES DE COBAYO".

Tesis que presenta la  
Q.F.B. Maricela Luna Muñoz  
como requisito para obtener  
el grado de Maestra en Bio-  
logía de la Reproducción  
Animal.

Agosto de 1986

70196

Esta tesis se realizó en la Sección de Bioquímica de la Reproducción, División de Bioquímica de la Unidad de Investigación Biomédica del Centro Médico Nacional, IMSS. Bajo la dirección del Dr. Alejandro Reyes F.

Con cariño y amor

A mis Padres: ,por el apoyo, cariño y comprensión  
que me brindaron

A Juan, Carlos y Javier

A mis familiares y amigos.

Con un profundo agradecimiento  
al Dr. Alejandro Reyes Fuentes  
por su valiosa asesoría.

Con un agradecimiento especial  
a mis compañeros de la Sección  
de Bioquímica de la Reproduc-  
ción: Adela, María Eugenia y  
Raúl por la ayuda y colabora-  
ción para realizar esta tesis.

Agradezco al Dr. Juan Tamayo y a la QFB. Rosa María Sierra Amor, del Departamento de Nefrología del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Subirán", por las facilidades y ayuda prestada para desarrollar este trabajo de tesis.

Agradezco a la QFB. Norma  
Hilda Vazquez Díaz por su  
grán ayuda en el trabajo  
mecanográfico de esta te-  
sis.

## I N D I C E

I.	INTRODUCCION	1
	1. Capacitación	
	2. Reacción Acrosomal	
	3. Nucleótidos Cíclicos	
	4. Adenilil Ciclasa	
II.	HIPOTESIS	23
III.	OBJETIVOS	25
IV.	MATERIAL Y METODOS	27
V.	REACTIVOS	39
VI.	RESULTADOS	41
VII.	DISCUSION	68
VIII.	CONCLUSIONES	92
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	97

## I. INTRODUCCION



## 1. Capacitación.

Para que el espermatozoide de mamífero sea capaz de fertilizar al ovocito debe permanecer un tiempo determinado en el aparato reproductor femenino. Este proceso fue descrito inicialmente por Chang y Austin en forma independiente y lo denominaron capacitación (1-3).

El tiempo que se requiere para que ocurra la capacitación varía con las especies (1-3) y para su estudio se ha dividido a este proceso en dos etapas secuenciales: la primera de ellas se lleva al cabo en el útero y la segunda en el oviducto, culminando esta última etapa en la región ampular en donde se sucede la reacción acrosomal (1, 2).

Durante el proceso de capacitación se llevan al cabo una serie de cambios fisiológicos, bioquímicos y ultraestructurales (3-6), así como la remoción de componentes proteicos que se adsorben al espermatozoide durante su tránsito al través del epidídimo y durante su interacción con el plasma seminal (2, 7, 8).

Entre estos componentes proteicos que se adsorben al espermatozoide se encuentra el factor discapacitante, el cual se ha sugerido actúa en la membrana bloqueando algunos receptores, grupos funcionales, canales de transporte de iones y actividades enzimáticas, impidiendo así que se lleve al cabo la reacción acrosomal (6-9). Se sabe que la interacción del factor discapacitante con la superficie del espermatozoide es reversible (2, 7-9).

Las modificaciones de la membrana plasmática que se presentan en el espermatozoide durante la capacitación incluyen la disminución en la carga neta negativa de su superficie, debido en parte a la acción de las hidrolasas (neuraminidasa y  $\beta$ -glucuronidasa) presentes en las secreciones del aparato reproductor femenino (10-11), así como a la redistribución de los grupos polares de los lípidos membranales con el consecuente aumento en la difusión lateral de los mismos y por lo tanto, en la fluidez membranar (6-12).

Por otra parte, se ha demostrado que los espermatozoides capacitados tanto in vivo como in vitro,

muestran una reducción en el marcaje con lectinas (concanavalina A) en algunas áreas de la membrana plasmática que cubre la región acrosomal (12, 13). Estos aspectos han permitido sugerir que la movilización regional y/o diferencial de las proteínas en las membranas del espermatozoide expone diferentes grupos funcionales, así como receptores a catecolaminas, nucleótidos cíclicos, hormonas esteroides y prostaglandinas (13, 14).

Aún más, mediante criofractura se ha demostrado que durante la capacitación de espermatozoides de hamster y cobayo se forman áreas libres de proteínas en las membrana plasmática y acrosomal externa, las cuales pueden representar áreas potenciales para la fusión membranal que sólo requieren  $Ca^{2+}$  para que se lleve al cabo la reacción acrosomal (13-15).

Estudios realizados en eritrocitos han indicado que las modificaciones en la permeabilidad a iones y sustratos, así como el aumento en la fluidez membranal, están asociadas con la liberación del colesterol membranal y la consecuente disminución en la relación molar colesterol/fosfolípidos (C/F) (16, 17).

Además, en esta célula se ha demostrado también que los constituyentes del plasma sanguíneo tales como lipoproteínas de alta densidad, lectinas, acil transferasas de colesterol y albúmina, participan en la remoción del colesterol de la membrana plasmática con la consecuente disminución en la relación C/F (16, 17).

La presencia de estos mismos componentes en el suero, secreción del oviducto y líquido folicular, sugiere que el intercambio C/F que ocurre entre el espermatozoide y estos fluidos durante la capacitación in vitro o in vivo se lleva al cabo por un mecanismo similar al señalado para los eritrocitos (6, 15, 18). Asimismo se ha señalado que la disminución en la relación C/F en la membrana plasmática del espermatozoide, está asociada con el aumento de la permeabilidad a  $Ca^{2+}$  que se observa durante la capacitación del espermatozoide, ya que se sabe que en los espermatozoides sin capacitar en los cuales existe una elevada relación molar C/F, la membrana plasmática periacrosomal es impermeable a  $Ca^{2+}$  (6, 15, 18, 19).

Cabe señalar que este mecanismo molecular es compatible con la reversibilidad del proceso de capacitación, ya que la adición de factores descapacitantes (sulfato de esteroides y colesterol) a suspensiones de espermatozoides induce un aumento en la relación C/F, generando así una disminución en la permeabilidad y fluidez de la membrana plasmática, lo que tiene como consecuencia la inhibición de la reacción acrosomal (6, 20, 21).

Otros cambios en la macromoléculas intrínsecas que modifican la estabilidad de la membrana del espermatozoide de mamífero incluyen los cambios conformacionales de las proteínas membranales. Mediante espectrofotometría de infrarojo se ha demostrado que una gran proporción de las proteínas que integran la membrana plasmática del espermatozoide sin capacitar, presentan una configuración  $\beta$  estable, en tanto que al incubar estas células en presencia de agentes que inducen la capacitación (AMPc\* y líquido folicular, entre otros) se modifica la configuración de estas proteínas a una menos estable ( $\alpha$ -hélice o enrollamiento al azar) (22). Estos cambios en la estructura membranal parecen estar asociados con

\* 3',5'-monofosfato de adenosina.

el incremento en el metabolismo y movilidad característicos del proceso de capacitación (2, 22).

Por lo tanto, durante la capacitación se llevan al cabo una serie de cambios en los componentes membranales intrínsecos tales como glicoproteínas, lípidos y proteínas, que al inducir cambios estructurales como los anteriormente señalados, permiten que se reúnan las condiciones adecuadas de permeabilidad y fluidez que faciliten los eventos de fusión y vesiculación membranal durante la reacción acrosomal.

Simultáneamente a los eventos antes mencionados se observa un aumento en la proporción de espermatozoides con movilidad unidireccional, vigorosa y progresiva (4, 23), y que le permite al espermatozoide transportarse al través del aparato reproductor femenino hacia la región ampular del oviducto, con la finalidad de interaccionar con el ovocito y fertilizarlo (4, 24). Cabe señalar que se ha determinado que este patrón de movilidad espermática está asociada con un aumento en la actividad glicolítica de

esta célula, sin embargo, el espermatozoide emplea también ciertos aminoácidos y fosfolípidos endógenos como fuente de energía para mantener la movilidad flagelar (6, 25, 26).

## 2. Reacción Acrosomal.

La primera etapa de la capacitación, en la cual los espermatozoides modifican tanto su patrón de movilidad y metabolismo así como las características estructurales y funcionales de la membrana, es requisito para que suceda la etapa denominada reacción acrosomal (3, 4).

Esta última etapa se caracteriza por la fusión y vesiculación de las membranas plasmáticas y acrosomal externa y está asociada con la "exocitosis" de las enzimas hidrolíticas contenidas en el acrosoma (27). Este proceso permite la penetración del espermatozoide al través de las capas que cubren al ovocito (cumulus oophorus, corona radiata, zona pellucida) e induce modificaciones en las características membranales del espermatozoide a nivel del segmento ecuatorial y/o en la región postacrosomal, las cua-

les permiten la fusión con la membrana del ovocito durante el proceso de fertilización (4, 15, 27).

Ahora bien, debido a su origen, estructuras y función, el acrosoma se ha comparado con un lisosoma o con un gránulo secretor (28). Por lo tanto, se ha señalado que una de las funciones que tienen en común estos organelos es la exocitosis, con características particulares en cada uno de ellos, ya que en las células somáticas se restaura la integridad membranal después del proceso secretor y durante la reacción acrosomal las membranas fusionadas se vesiculan y se pierden como parte del mismo (27, 29). Sin embargo el proceso de exocitosis en las células somáticas y la reacción acrosomal en el espermatozoide de mamífero coinciden tanto en su dependencia del influjo de  $\text{Ca}^{2+}$ , como en la formación de áreas libres de partículas intramembranales que se han considerado áreas potenciales para la fusión membranal (27-29).

En la iniciación y regulación de la reacción acrosomal participan una serie de componentes del acrosoma y del microambiente del oviducto, con el que es-



ta gameta interacciona. Entre los componentes de la secreción tubaria se encuentran iones ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{PO}_4^{-3}$ ), hormonas (progesterona, estradiol), catecolaminas y nucleótidos cíclicos (AMPc y GMPc\*) entre otros (2-4).

Por otra parte se ha determinado que el acrosoma del espermatozoide de mamífero posee múltiples sistemas enzimáticos tales como acrosina, fosfolipasas  $A_2$  y C, ATPasas dependientes de  $\text{Mg}^{2+}$ , de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y de  $\text{Ca}^{2+}$ , etc (4, 27). Estos sistemas enzimáticos parecen estar involucrados en la regulación de diversas expresiones de función celular tales como la capacitación-reacción acrosomal (4, 27).

Se ha sugerido que la enzima con actividad de tripsina (acrosina) presente en el acrosoma, al activar se, hidroliza a las proteínas de la membrana acrosomal externa facilitando su fusión con la membrana plasmática. Sin embargo su participación en los eventos membranales involucrados en la reacción acrosomal, evaluada mediante la utilización de inhibidores de proteasas, parece variar dependiendo de la especie animal de que se trate (27, 30-32).

\* 3'5'-monofosfato de guanosina.

Asimismo, las observaciones realizadas utilizando inhibidores de fosfolipasa A<sub>2</sub>, fosfolipasa A<sub>2</sub> exógena o bien los productos de su actividad (lisofosfolípidos y ácidos grasos libres), sugieren que esta enzima está involucrada en la regulación de la reacción acrosomal del espermatozoide de mamífero (32-34). Además, se ha demostrado la presencia de actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub> en la fracción particulada y/o en los componentes solubles liberados durante la reacción acrosomal del espermatozoide de hamster y cobayo (3, 5, 6).

Debido a que la reacción acrosomal es dependiente del incremento en la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup> (23, 37, 38), se ha sugerido también la participación de la fosfolipasa C en la fusión y vesiculación de las membranas plasmática y acrosomal externa. Esta enzima es responsable de la producción de ácido fosfatídico, el cual es considerado un ionóforo biológico para Ca<sup>2+</sup> (23, 37, 38).

En las membranas acrosomales de los espermatozoides de mamífero se ha detectado la presencia de ATPasas dependientes de Mg<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y de Ca<sup>2+</sup> y se ha su-

gerido que estas enzimas participan en la regulación de la reacción acrosomal (36, 39-42). La inhibición de la ATPasa dependiente de  $Mg^{2+}$  utilizando DCCD\* ó NBD-C1\*\*, induce reacción acrosomal en los espermatozoides de hamster (39, 40); esta enzima está asociada con una bomba de  $H^+$ , por lo que juega un papel importante en la regulación del pH intracrosomal. Por otra parte, la actividad de la ATPasa dependiente de  $Na^+$ ,  $K^+$  en los espermatozoides de cobayo se incrementa durante la incubación en sistemas de capacitación in vitro (36, 41); en el hamster la inhibición de esta enzima interfiere con la reacción acrosomal (41).

Gordon y col (42), sugirieron que una ATPasa dependiente de  $Ca^{2+}$  regula el influjo de este catión divalente al acrosoma; sin embargo, la participación de esta ATPasa en la inducción de la reacción acrosomal es controversial, ya que la actividad de esta enzima disminuye en los espermatozoides capacitados in vitro (36).

\* N,N'-diclohexilcabodimida.

\*\* 4-cloro-7-nitrobenzofurano.

### 3. Nucleótidos Cíclicos.

En los espermatozoides de mamífero, los nucleótidos cíclicos regulan varias funciones importantes como por ejemplo la movilidad, el metabolismo y la capacitación. Estos compuestos pueden ejercer su efecto mediante el intercambio de nucleótidos cíclicos entre los espermatozoides y las secreciones del aparato reproductor femenino, o bien mediante la modulación de la actividad de las enzimas que regulan su concentración: fosfodiesterasas y adenilil-guanilil ciclasas.

Diferentes investigadores han demostrado que la movilidad de los espermatozoides de mamífero (tanto de cauda de epidídimo como eyaculados), se incrementa debido a la adición de inhibidores de fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos a los sistemas de capacitación in vitro (43, 44) y han sugerido que este efecto se debe a que estos inhibidores mantienen elevada la concentración intracelular de AMPc (44). Además, la adición de AMPc a estos sistemas de capacitación tiene efectos similares sobre la movilidad espermática (43, 44). Este efecto del AMPc

sobre la movilidad depende, en parte, del estado de maduración de las gametas ya que AMPc no induce modificaciones en la movilidad en espermatozoides de cabeza y cuerpo del epidídimo (44, 45).

Se han propuesto tres hipótesis para explicar los mecanismos por los cuales el AMPc participa en la regulación de la movilidad: (a) un efecto directo del AMPc intracelular sobre el sistema flagelar; (b) activación de las proteínas-quinasas dependientes de AMPc con la consecuente fosforilación de proteínas asociadas con la movilidad; (c) un efecto directo del AMPc extracelular a nivel membranar con un cambio subsecuente en el transporte de iones (44, 46, 47).

La respiración y glicólisis del espermatozoide se incrementan durante la capacitación. Estos cambios son estimulados también por inhibidores de fosfodiesterasas, AMPc o análogos de éste (44, 45), lo cual sugiere que AMPc está involucrado en la regulación del metabolismo del espermatozoide durante la capacitación.

Por otra parte, la participación de AMPc en la reacción acrosomal del espermatozoide de mamífero aún es controversial, ya que se ha reportado que la adición de concentraciones micromolares de AMPc o de sus análogos induce la reacción acrosomal en los espermatozoides de cobayo y ratón (48), sugiriéndose incluso que el incremento en la concentración intracelular de AMPc que se observa durante la capacitación in vitro, está asociada con la iniciación de la reacción acrosomal (49). Sin embargo, existen reportes que señalan que tanto las metilxantinas como análogos de AMPc inhiben la capacitación-reacción acrosomal en los espermatozoides de cobayo y hamster (50, 51). Por lo tanto, se requieren mayores estudios para elucidar la participación de AMPc en la regulación de esta expresión de función celular en el espermatozoide.

En diversas células somáticas, se ha señalado que el GMPc parece estar involucrado en la regulación de múltiples funciones celulares (52). Asimismo, se ha demostrado que la actividad de guanilil ciclase, responsable de la regulación de la concentración de GMPc, se localiza tanto en la fracción solu

ble como en la fracción particulada de estas células (53, 54).

En los espermatozoides de toro se ha demostrado que la adición de análogos de GMPc a los sistemas de capacitación in vitro induce un incremento en la movilidad flagelar (55). Sin embargo, este efecto solo se ha observado en presencia de inhibidores de fosfodiesterasas (44, 55). Aún más en los espermatozoides de esta especie, capacitados in vitro en presencia de inhibidores de fosfodiesterasas, se ha demostrado también que la concentración intracelular de GMPc se incrementa (55), lo cual pudiera ser indicativo de su participación en los eventos de capacitación y reacción acrosomal.

No obstante que en los espermatozoides de erizo de mar Gray y col han demostrado que el sistema guanilil ciclasa está presente en la fracción soluble de estas células e inclusive han demostrado su participación en la regulación del metabolismo, movilidad y reacción acrosomal (56, 57), en los espermatozoides de la mayoría de los mamíferos no se ha detectado aún la actividad de guanilil ciclasa (43), por

lo que el papel fisiológico del GMPc en estas células aún está en vías de ser determinado.

En el aparato reproductor femenino existe una relación diferencial en la concentración de nucleótidos cíclicos (2), ya que en la secreción uterina predomina el AMPc, lo cual puede relacionarse con el efecto de este compuesto en las etapas iniciales de la capacitación en el microambiente uterino, mientras que en la secreción de oviducto el GMPc se encuentra en una concentración mayor. Los cambios en la relación AMPc/GMPc en el oviducto parecen ser importantes en relación con la inducción de la reacción acrosomal.

#### 4. Adenilil Ciclasa.

En la regulación de la concentración de AMPc en los espermatozoides de mamífero participan tanto las fosfodiesterasas como la adenilil ciclasa (44, 58). Esta enzima, la adenilil ciclasa, ha sido ampliamente estudiada en diversos tipos de células somáticas debido tanto a las diversas funciones celulares en que está involucrada, así como a la complejidad de



el o los mecanismos de su regulación. Estudios recientes han señalado que el sistema adenilil ciclasa es un complejo proteico constituido por tres componentes que están integrados en los lípidos de la membrana plasmática: el receptor (R), la proteína que une específicamente guanin nucleótidos (N) y el componente catalítico (C) (59-61).

La actividad del sistema adenilil ciclasa se inicia cuando el ligando exógeno específico interacciona con los receptores presentes en la superficie celular. Estos receptores están involucrados ya sea en la activación o en la inhibición de la enzima. Entre los receptores estrechamente relacionados con la activación se encuentran los receptores a diversos agonistas  $\beta$  adrenérgicos, ACTH\* y gonadotrofinas, entre otros; por otra parte, los que participan en la inhibición son los receptores para  $\alpha_2$ -adrenergicos, agonistas muscarínicos y péptidos opioides (59-61).

Subsecuentemente a la formación del complejo hormona-receptor ocurre la interacción de éste con la proteína reguladora denominada Ns (estimuladora),

\* Hormona adrenocorticotrófica.

cuando el primer mensajero activa el sistema enzimático, o bien Ni (inhibidora), cuando el primer mensajero tiene actividad inhibitoria (62). En consecuencia, las proteínas Ns y Ni son quienes controlan la actividad del componente catalítico C del sistema adenilil ciclasa, el cual es responsable de llevar al cabo la síntesis de AMPc utilizando como sustrato ATP\* (61-63).

Se han aislado, purificado y determinado las características fisicoquímicas de los componentes Ns y Ni. Por lo tanto, se sabe que la subunidad Ns posee una estructura oligomérica constituida tanto por una proteína  $\beta$  de 35,000 daltones como por una proteína  $\alpha_s$  de 42,000 daltones. Esta última proteína es necesaria para la activación de la adenilil ciclasa por hormonas, guanin nucleótidos, NaF y además, posee un sitio específico para la ribosilación de ADP\*\* por toxina del cólera (60-61).

Asimismo, se ha determinado que la subunidad Ni es un oligómero constituido por una proteína  $\beta$  de 35,000 daltones (idéntica a la proteína  $\beta$  de la subunidad Ns) y una proteína  $\alpha_i$  de 41,000 daltones, la

\* Trifosfato de adenosina.

\*\* Difosfato de adenosina.

cual se caracteriza por presentar un sitio de alta afinidad para guanin nucleótidos, así como un sitio para la ribosilación de ADP por toxina de Bordetella pertusis (61, 64).

En contraste a los diversos estudios que existen sobre las características y propiedades de los componentes R y N del sistema adenilil ciclasa (60-62) es discreta la información existente sobre las características fisicoquímicas del componente C (63). Esto se debe, en parte, a que el componente C es sumamente inestable bajo las condiciones experimentales que permiten su aislamiento y purificación. No obstante, se ha señalado que al estar aislado de otros componentes (R ó N), no es afectado por la unión de activadores o inhibidores, aunque se ha determinado un aumento en su actividad catalítica en presencia de  $Mn^{2+}$  o forskolina (63-65).

Ahora bien, existen evidencias de que tanto en las células germinales como en los espermatozoides de diferentes especies de mamífero, la adenilil ciclasa tiene una actividad mayor en comparación con la determinada en otras estirpes celulares (44, 66-69).

Esta actividad se encuentra asociada principalmente a la fracción soluble en las células germinales, en tanto que en los espermatozoides maduros la actividad se localiza principalmente en la fracción particulada (44, 66-69). En consecuencia, se ha propuesto que la ontogénesis de la adenilil ciclase en el espermatozoide maduro involucra la transición de la actividad asociada con la fracción soluble (presente en las células germinales) a la fracción membranal, sugiriéndose incluso que este cambio ocurre durante la diferenciación de las espermátides a espermatozoides (66-67).

Los estudios dirigidos a establecer los mecanismos de regulación del sistema adenilil ciclase en el espermatozoide de mamífero, han permitido señalar que esta enzima posee características particulares en relación a otras estirpes celulares, ya que no es activada por hormonas, guanin nucleótidos, toxina del cólera y NaF los cuales, como ya se señaló anteriormente, son activadores de esta enzima en las células eucariontes (44, 60, 61, 68-69). Por lo tanto, es de fundamental importancia el estudiar las características bioquímicas de la adenilil ciclase

en el espermatozoide de mamífero con la finalidad de, en otra etapa, determinar la posible vía de regulación de esta actividad enzimática en esta célula.

## II. HIPOTESIS

Se propone que en la regulación de la reacción acrosomal del espermatozoide de cobayo están involucradas concentraciones críticas de AMPc y GM<sup>DP</sup>c, tanto exógenas como endógenas y por lo tanto que en el acrosoma de estas células existe una actividad importante de adenilil ciclasa, la cual forma parte de los mecanismos de modulación de este evento.

### III. OBJETIVOS



1. Determinar el efecto de los nucleótidos cíclicos exógenos (AMPc y GMPC) en la dinámica de la reacción acrosomal de los espermatozoides de cobayo.
2. Determinar mediante citoquímica la localización subcelular de la actividad de adenilil ciclasa en los espermatozoides de cobayo.
3. Determinar parte de las características bioquímicas de la actividad de adenilil ciclasa en el acrosoma de los espermatozoides de cobayo.

#### IV. MATERIAL Y METODOS

Como modelo experimental se utilizaron cobayos machos, cepa hartley, adultos, fértiles de 8-10 meses de edad, los cuales se sacrificaron por dislocación cervical. Una vez obtenidos los complejos testículo-epidídimo por laparatomía se procedió a disecar la cauda del epidídimo, misma que se colocó en una caja petri con solución de NaCl 0.154 M, ajustada a pH 7.4

Los espermatozoides se obtuvieron mediante la perfusión de la cauda del epidídimo, al través del conducto deferente, con solución de NaCl 0.154 M, pH 7.4 (70). La suspensión celular se lavó y concentró por centrifugación a 300 xg durante 10 min (2 veces), resuspendiendo los espermatozoides en un sistema químicamente definido (MCM\*), libre de calcio, pH 7.4 (71). Los espermatozoides se contaron utilizando una cámara de Neubauer y la concentración celular se ajustó por dilución a  $10^8$  espermatozoides/ml

Para cumplir con el primer objetivo de este trabajo, que implicó determinar el efecto de los nucleótidos cíclicos exógenos (AMPC y GMPC) en la dinámica de

\* Medio Capacitante Mínimo.

la reacción acrosomal, se utilizaron por separado alícuotas de  $25 \times 10^6$  espermatozoides resuspendidos en MCM libre de  $\text{Ca}^{2+}$ , pH 7.4 a  $37^\circ\text{C}$ , a las que se adicionaron los siguientes compuestos:

- a) 1.25 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  (control).
- b) 1.25 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  y AMPc a las concentraciones de 10 y 100  $\mu\text{M}$ .
- c) 1.25 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  y GMPc a las concentraciones de 10 y 100  $\mu\text{M}$ .
- d) 1.25 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  y la relación AMPc/GMPc 10 $\mu\text{M}$ /100 $\mu\text{M}$  o bien 100 $\mu\text{M}$ / 10 $\mu\text{M}$ .

Todos los sistemas se ajustaron a un volumen final de 500  $\mu\text{l}$  con MCM y se incubaron durante 4 horas a  $37^\circ\text{C}$  bajo una atmósfera de 5% de  $\text{CO}_2$  + 95% de aire, con la finalidad de que las células experimenten el proceso de capacitación-reacción acrosomal en este sistema no sincrónico (70).

Cada hora durante el periodo de incubación se tomaron alícuotas de 50  $\mu$ l de las suspensiones celulares las que se colocaron en portaobjetos excavados precalentados a 37°C, se cubrieron con cubreobjetos y se observaron en un microscopio de contraste de fases (Carl Zeiss), equipado con una platina termorregulable (Microlec Warm Stage) a 37°C para evaluar tanto la proporción de espermatozoides móviles y las características de la movilidad así como el porcentaje de células que llevaron al cabo la reacción acrosomal (23, 70).

El porcentaje de espermatozoides que presentaron reacción acrosomal (% R A) se calculó utilizando la siguiente formula:

$$\% \text{ R A} = \frac{\text{Espermatozoides móviles sin acrosoma}}{\text{Total de espermatozoides móviles}} \times 100$$

El segundo objetivo de este trabajo consistió en determinar mediante citoquímica la localización sub celular de la actividad de adenilil ciclasa en el espermatozoide de cobayo. Para esta finalidad, el análogo de ATP que se utilizó como sustrato fue el

70196

AMP-PNP\*, el cual no es hidrolizado por la actividad de otras ATPasas diferentes a la adenilil ciclase (72). La hidrólisis del AMP-PNP genera como productos AMPc + PNP\*\*; este último producto en presencia de  $Pb^{2+}$ , forma un complejo electrodenso en los sitios de actividad de adenilil ciclase (72) (figura 1).

Para esta determinación se utilizaron alícuotas de  $25 \times 10^6$  células obtenidas mediante la metodología descrita anteriormente, a  $4^\circ C$ , excepto que el amortiguador fue sustituido por tris-maleato 20 mM, pH 7.4

Los espermatozoides se incubaron durante 10 min a  $30^\circ C$  en el sistema amortiguador antes señalado en un volumen final de 1 ml en presencia de:  $MgSO_4$  4 mM, SQ 20,009\*\*\* 0.2 mM, dextrán 7%,  $Pb(NO_3)_2$  1 mM, AMP-PNP 0.3 mM (72). En esta determinación se incluyeron también sistemas de incubación libres de AMP-PNP o  $Pb(NO_3)_2$ , con la finalidad de tener el control de precipitación inespecífica y el control negativo correspondiente.

\* 5'-adenilil-imidodifosfato.

\*\* Imidodifosfato.

\*\*\* 1-etil-4-(isopropilidenedrazina)-1H-pirazolo-(3,4,6)-piridina-5-ácido carboxílico, hidroxiclورو del éter etílico.

La reacción se terminó mediante la adición de 1 ml de una solución de glutaldehído 2% y formaldehído 2% en amortiguador de cacodilato de sodio 100 mM, pH 7.4 lo cual permitió también fijar a estas células. Para lavar y concentrar a los espermatozoides, las suspensiones celulares se centrifugaron a 300 xg durante 30 min resuspendiéndose por separado en solución de cacodilato de sodio 100 mM, pH 7.4 y centrifugándose nuevamente (2 veces) en las condiciones antes señaladas (72).

La postfijación de los espermatozoides se realizó adicionando una solución de  $\text{OsO}_4$  al 2% en amortiguador de cacodilato de sodio 100 mM, pH 7.4 (1:1 v/v), e incubando durante 120 min a 4°C. Una vez concluido el periodo de incubación, las células se lavaron y concentraron por centrifugación (3 veces) bajo las condiciones señaladas previamente (72).

El paquete celular (espermatozoides) se deshidrató mediante la utilización de alcoholes ascendentes (70%, 80%, 90% y absoluto) y óxido de propileno. Posteriormente los paquetes celulares se incluyeron en una resina epóxica (Epon 812) y se obtuvieron

cortes finos de 70 nm en un ultramicrotomo (Reichter), mismos que se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo (12). Las preparaciones obtenidas se analizaron en un microscopio electrónico (Phillips 300).

El tercer objetivo de este trabajo implicó determinar algunas características bioquímicas de la actividad de adenilil ciclasa en el acrosoma del espermatozoide de cobayo, para lo cual se procedió de la siguiente forma:

Subsecuentemente a la obtención de los espermatozoides a 4°C, siguiendo la metodología descrita previamente, se procedió a separar los acrosomas para lo cual se homogeneizó la suspensión celular en un vaso Potter-Elvehjem con émbolo de teflón, durante 1 min a la velocidad de "3" utilizando un motor Caframo Stirrer (Mod. RZR1-64), seguido de agitaciones a 4°C en un dispositivo mecánico (Vortex-Genie Mod. 550-G), a intensidades de "3" y "10" durante 3 min y 30 seg, respectivamente (54). El desprendimiento de los acrosomas se comprobó mediante un microscopio de contraste de fases.



A partir de esta preparación se obtuvieron las dos fracciones subcelulares que se utilizaron en esta etapa del estudio: (a) fracción enriquecida de acrosomas (matriz y membranas acrosomales) (FEA) y (b) membranas acrosomales (MA).

- (a) Para la obtención de la fracción enriquecida de acrosomas, de alícuotas de  $2 \times 10^8$  espermatozoides, se separaron los acrosomas mediante los procedimientos mecánicos descritos previamente; se centrifugó a 1,000 xg durante 20 min a 4°C y se recolectaron los sobrenadantes, en los cuales se obtuvieron simultáneamente tanto membranas acrosomales como matriz acrosomal, libre de espermatozoides.
- (b) Para obtener la fracción de membranas acrosomales se tomaron alícuotas de  $10^8$  células procesadas para separar los acrosomas. Estas alícuotas se estratificaron sobre gradientes discontinuos de sacarosa formados con las concentraciones de 0.9 M, 1.08 M, 1.2 M y 1.3 M en amortiguador de Tris-HCl 50 mM, pH 7.4. Estos gradientes se centrifugaron a 65,000 xg duran-

te 120 min a 4°C, utilizando un rotor SW 27 y una ultracentrífuga Beckman L5-75; las membranas acrosomales se recolectaron de la interfase entre las concentraciones 0.9 M/1.08 M de sacarosa. Para lavar y concentrar las membranas se adicionaron 5 volúmenes de Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, centrifugandose esta suspensión en un rotor SW 65 a 100,000 xg durante 30 min a 4°C (73). El precipitado de membranas acrosomales se resuspendió en 100 µl de la misma solución amortiguadora.

La pureza de la fracción enriquecida de acrosomas y de las membranas acrosomales se evaluó tanto por microscopía electrónica de transmisión (74), como mediante la determinación de actividades enzimáticas: 5'Nucleótidasa, ATPasa dependiente de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, ATPasa dependiente de Ca<sup>2+</sup>, hialuronidasa y acrosina (75, 76). En estas fracciones se determinaron también las concentraciones de proteínas y ADN\* (77, 78).

La actividad de adenilil ciclase se evaluó en las fracciones FEA y MA utilizando la siguiente mezcla

\* Acido desoxirribonucléico.

de reacción:  $MgCl_2$  5 mM, albúmina sérica bovina 0.1%, SQ 20,0009 100  $\mu M$ , piruvato cinasa 8 U/sistema, ácido fosfoenol pirúvico 12.5 mM y ATP 2 mM en amortiguador Tris-HCl 20 mM, pH 7.8 en un volumen final de 100  $\mu l$  (68, 79).

La reacción se inició por la adición al sistema de incubación, de 1-10  $\mu g$  de proteínas correspondientes a las fracciones FEA y MA. Estos sistemas se incubaron durante 15 min para MA y 30 min para FEA, a 30°C. La reacción se terminó por la adición de 50  $\mu l$  de amortiguador de acetatos (concentración final de 50 mM, pH 3.9) (80).

Los sistemas fueron evaporados a sequedad a 60°C, se resuspendieron con 1 ml de amortiguador de acetatos 50 mM, pH 6.2 y se tomaron alícuotas para determinar la concentración de AMPc formado utilizando el método de radioinmunoanálisis descrito por Tamayo y col (80-82).

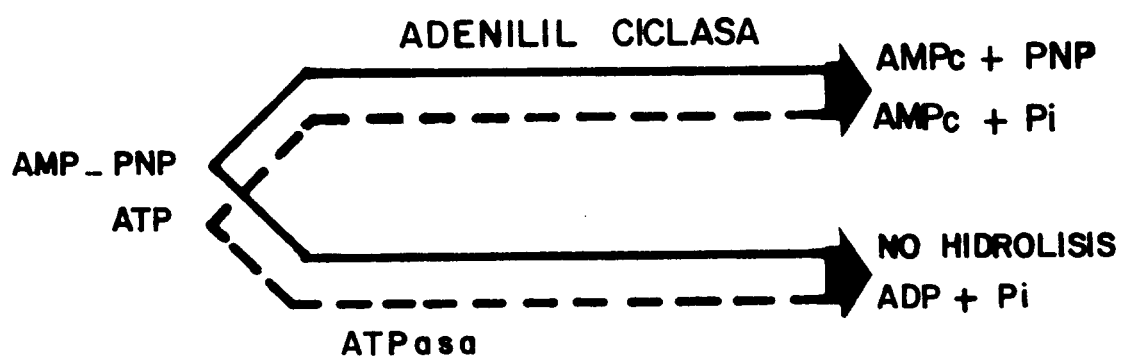
Para determinar el comportamiento cinético de la actividad de adenilil ciclase en las fracciones FEA y MA, se hicieron variaciones en las siguientes condi

ciones experimentales:

- (a) concentraciones de  $Mn^{2+}$  (2.5-10 mM)
- (b) concentraciones del sustrato ATP (1-3 mM)
- (c) tiempos de incubación (5-30 min)
- (d) temperatura de incubación (30 y 37°C)
- (e) pH (6.0-9.0).

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante la prueba t de Student y el método de mínimos cuadrados para el ajuste de la recta y el análisis de regresión lineal (83).

FIGURA 1



Esquema de la hidrólisis de ATP y AMP-PNP por adenilil ciclasa y ATPasas. Modificado de Wagner y col. (72).

## V. REATIVOS

Los reactivos que se utilizaron en este estudio fueron grado químicamente puro y se obtuvieron de las siguientes casas comerciales:

Merck, Sigma, J.T. Baker. Los reactivos utilizados para determinar el AMPc mediante radioinmunoanálisis, fueron donados por el Departamento de Nefrología del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubiran".

70196

## VI. RESULTADOS



La primera etapa de trabajo implicó determinar el efecto de AMPc y GMPc exógenos en la dinámica de la reacción acrosomal del espermatozoide de cobayo, utilizando sistemas de capacitación no sincrónicos para inducir la reacción acrosomal in vitro.

Las características de la movilidad de estas células se evaluaron subjetivamente tanto en los sistemas de incubación considerados como control (MCM adicionado de 1.25 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ ), como en los sistemas experimentales. En el caso de los controles se observó que aproximadamente el 80% de las células se mantuvieron móviles durante el periodo de incubación de 4 horas.

Por otra parte, en este mismo periodo de tiempo, se determinó en los espermatozoides incubados en presencia de AMPc que el porcentaje de células móviles no se modificó con respecto al control, aunque se observó un aumento en la intensidad de la movilidad flagelar. En presencia de GMPc, no se observaron modificaciones aparentes en la movilidad espermática en relación al control.

Utilizando las condiciones experimentales consideradas óptimas para conducir capacitación en los espermatozoides de cobayo (control), se obtuvo 13.6%, 35.5%, 54.3% y 72.0% de células con reacción acrosomal al término de 1, 2, 3 y 4 horas de incubación, respectivamente (gráficas 1, 2 y 3).

Por otra parte, la incubación de los espermatozoides en presencia de 10 y 100  $\mu\text{M}$  de AMPc indicaron que a estas concentraciones no se observó algún efecto significativo sobre la reacción acrosomal después de la primera y segunda hora de incubación; sin embargo, durante la tercera y cuarta hora se observó una inhibición de hasta 30 y 40% en la reacción acrosomal al comparar con su control respectivo ( $p < 0.01$ ). No se observaron diferencias en relación al efecto de AMPc entre las concentraciones de 10 y 100  $\mu\text{M}$  (gráfica 1).

Los espermatozoides incubados en presencia de GMPc mostraron un incremento significativo en el porcentaje de la reacción acrosomal al comparar con el control ( $p < 0.01$ ). Este efecto sobre la reacción acroso

somal fue significativamente mayor cuando se utilizó 100  $\mu\text{M}$  de GMPc en relación con 10  $\mu\text{M}$ ; ya que en la primera hora de incubación el % R A aumentó hasta 3 veces con 100  $\mu\text{M}$  de GMPc, en tanto que con 10  $\mu\text{M}$  el aumento fue de 1.9 veces en relación al control. Asimismo, a la segunda, tercera y cuarta horas, el aumento en el % R A inducido por este nucleótido fue de hasta 1.3 veces para la concentración de 10  $\mu\text{M}$  y de 1.6 veces para 100  $\mu\text{M}$ , respectivamente (gráfica 2).

Ahora bien, los resultados correspondientes a la adición conjunta de estos nucleótidos señalan que la relación AMPc/GMPc con predominio de AMPc, inhibió significativamente el % R A a la tercera y cuarta horas con respecto a su control. Por otra parte, cuando se utilizó un predominio de GMPc se obtuvo un incremento significativo en el porcentaje de la reacción acrosomal en la tercera y cuarta horas de incubación (gráfica 3). Cabe señalar, que las características de la movilidad no se modificaron bajo estas condiciones experimentales, en relación a su control.

Los resultados de la determinación de la presencia de la actividad de adenilil ciclasa en los espermatozoides de cobayo mediante citoquímica permiten señalar lo siguiente:

Bajo las condiciones utilizadas, observamos que los espermatozoides incubados en presencia del sustrato (AMP-PNP), presentaron la formación de un complejo electrodensito de imidodifosfato-Pb<sup>2+</sup> en los sitios de actividad enzimática, localizados principalmente en la cara interna de la membrana plasmática de la región que cubre al acrosoma; también se observaron algunos precipitados cercanos a las fibras densas externas y en las mitocondrias de la pieza media. No se observaron estos complejos electrodensos al incubar a los espermatozoides en ausencia de AMP-PNP o de Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (controles negativos) (Fig. 2).

Para la realización del tercer objetivo de este trabajo, que implicó determinar algunas características bioquímicas de la actividad de adenilil ciclasa, se utilizaron las fracciones FEA y MA obtenidas a partir de espermatozoides a los cuales se separó el acrosoma mediante los procedimientos mecánicos des-

critos en la sección correspondiente. La eficiencia de los procedimientos para separar los acrosomas se evaluó mediante microscopía de contraste de fases y microscopía electrónica de transmisión, lo cual permite señalar que en más del 90% de las células el acrosoma se separó del espermatozoide a nivel del segmento ecuatorial, sin daño aparente en las demás estructuras (pieza media y flagelo).

La evaluación de la fracción de membranas acrosomales mediante microscopía electrónica de transmisión indicó un enriquecimiento y pureza adecuados (Fig. 3).

Los resultados correspondientes a la determinación bioquímica de la pureza de las fracciones FEA y MA están expresados en el cuadro 1, donde se muestra que las actividades específicas de 5'nucleotidasa, ATPasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , y ATPasa dependiente de  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  son 4, 5, y 9 veces mayores, respectivamente, en la fracción MA en relación a FEA. Asimismo se determinó que la actividad de hialuronidasa está asociada con FEA en tanto que la actividad de acro-

sina no fue detectada en la fracción de MA.

Por otra parte, el estudio de las características bioquímicas de adenilil ciclasa en las fracciones FEA y MA del espermatozoide de cobayo, permite señalar lo siguiente:

En este estudio determinamos que a las diferentes concentraciones de  $Mn^{2+}$  utilizadas (2.5-10 mM), este catión divalente tiene un efecto activador del sistema adenilil ciclasa, tanto en FEA como en MA, al comparar la actividad con respecto a la obtenida en condiciones basales. El incremento en la actividad de adenilil ciclasa en presencia de 2.5, 5 y 10 mM de  $Mn^{2+}$  fue de hasta 2, 3.5 y 5 veces, respectivamente, en relación a la actividad evaluada en condiciones basales tanto en FEA como en MA (gráfica 4).

Al expresar los resultados obtenidos mediante una gráfica de Lineweaver-Burk o doble recíproca, se determinó que la  $K_m$  para  $Mn^{2+}$  en MA fue de 6.49 mM y el  $1/V_{max}$  fue de 1.13 (gráfica 5). En FEA se obtuvo una  $K_m$  para  $Mn^{2+}$  de 20.3 mM y un  $1/V_{max}$  de 0.9 (gráfica 6).

En la gráfica 7 se muestra la actividad de adenilil ciclasa obtenida utilizando diferentes concentraciones de proteínas (1-10 ug) de FEA y MA, tanto en condiciones basales como en presencia de  $Mn^{2+}$ . En estas condiciones, se observa nuevamente que la actividad de adenilil ciclasa, en ambas fracciones es significativamente mayor en presencia de  $Mn^{2+}$  en relación con la actividad basal ( $p < 0.005$ ). Asimismo, en FEA y MA observamos un comportamiento lineal en relación a la concentración de proteínas utilizado, tanto en condiciones basales como en presencia del activador.

Por otra parte, en presencia de  $Mn^{2+}$ , se determinó que la actividad de adenilil ciclasa en la fracción FEA se incrementó en forma progresiva y lineal en relación a los tiempos de incubación estudiados (10, 20 y 30 min); en consecuencia el incremento mayor se obtuvo en el periodo de incubación de 30 min ( $p < 0.005$ ) (gráfica 8). Asimismo al incubar la fracción MA durante 5, 10, 15 y 20 min en presencia de este catión divalente, se observó un incremento en esta actividad enzimática con respecto al tiempo de incubación. La cinética de esta actividad demos-

tró ser lineal hasta el periodo de incubación de 15 min, ya que no se detectó una diferencia significativa en la actividad enzimática entre 15 y 20 min de incubación (gráfica 9).

De acuerdo con estos resultados se establecieron como tiempos de incubación para la determinación de esta actividad en fases experimentales subsecuentes 15 y 30 min para MA y FEA respectivamente. Es importante señalar que la actividad enzimática en ausencia de  $Mn^{2+}$  también mostró un comportamiento lineal, similar al observado en presencia de este catión.

La determinación de la actividad de adenilil ciclasa en las fracciones FEA y MA en presencia de  $Mn^{2+}$ , en función de diferentes concentraciones de sustrato (1, 2 y 3 mM de ATP) indicó lo siguiente: en FEA se observó una actividad específica significativamente mayor al utilizar las concentraciones de 2 y 3 mM de ATP; por el contrario, en la fracción MA no se observaron diferencias en la actividad de adenilil ciclasa con respecto a las diferentes concentraciones de ATP estudiadas (gráfica 10).



En la gráfica 11 está representado el efecto de 2 temperaturas de incubación sobre la actividad de adenilil ciclasa en FEA y MA, tanto en condiciones basales como en presencia de  $Mn^{2+}$ . Bajo estas condiciones experimentales no se observaron diferencias significativas en la actividad específica determinada a 30 y 37°C.

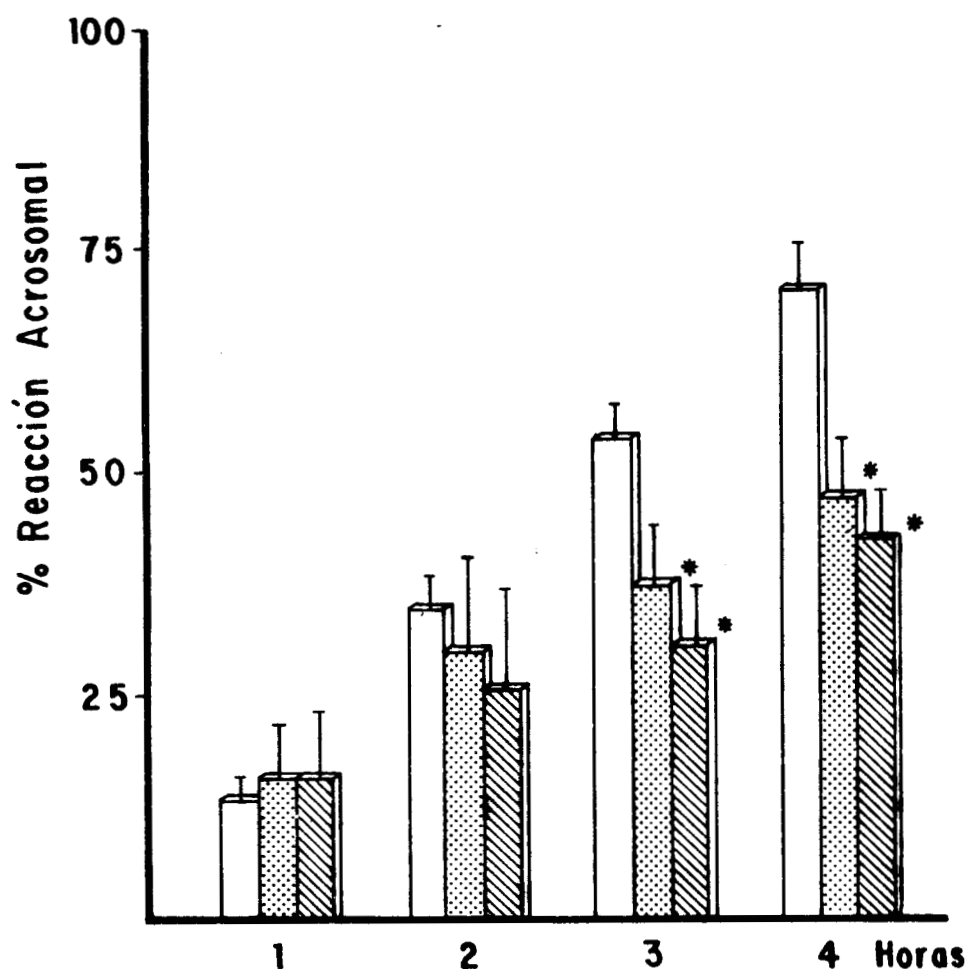
Los resultados obtenidos al determinar la actividad de adenilil ciclasa dependiente de  $Mn^{2+}$  en el intervalo de pH entre 6.0 y 9.0, indicaron que el pH óptimo para la evaluación de la actividad de esta enzima es de 7.8 tanto para FEA como para MA. A este pH, la actividad específica fue de  $0.383 \pm 0.131$  nmolas de AMPc/min/mg de proteínas para FEA y de  $2.74 \pm 0.715$  para MA (gráfica 12).

En el cuadro 2 está expresada la actividad específica del sistema adenilil ciclasa, evaluada bajo las condiciones que, en base a los resultados obtenidos en este estudio, fueron consideradas óptimas: 10 mM de  $Mn^{2+}$ ; 2 mM de ATP; 5 ug de proteínas, pH 7.8 y tiempo de incubación de 15 min para MA y 30 min para FEA, a 30°C. En estas condiciones experimentales,

70190

la actividad específica de adenilil ciclase en condiciones basales es 9 veces mayor en la fracción MA en relación a la determinada en FEA. Asimismo, se observó un aumento en la actividad basal de hasta 5 veces en presencia de 10 mM de  $Mn^{2+}$ , en ambas fracciones.

## EFECTO DE AMPc EN LA REACCION ACROSOMAL

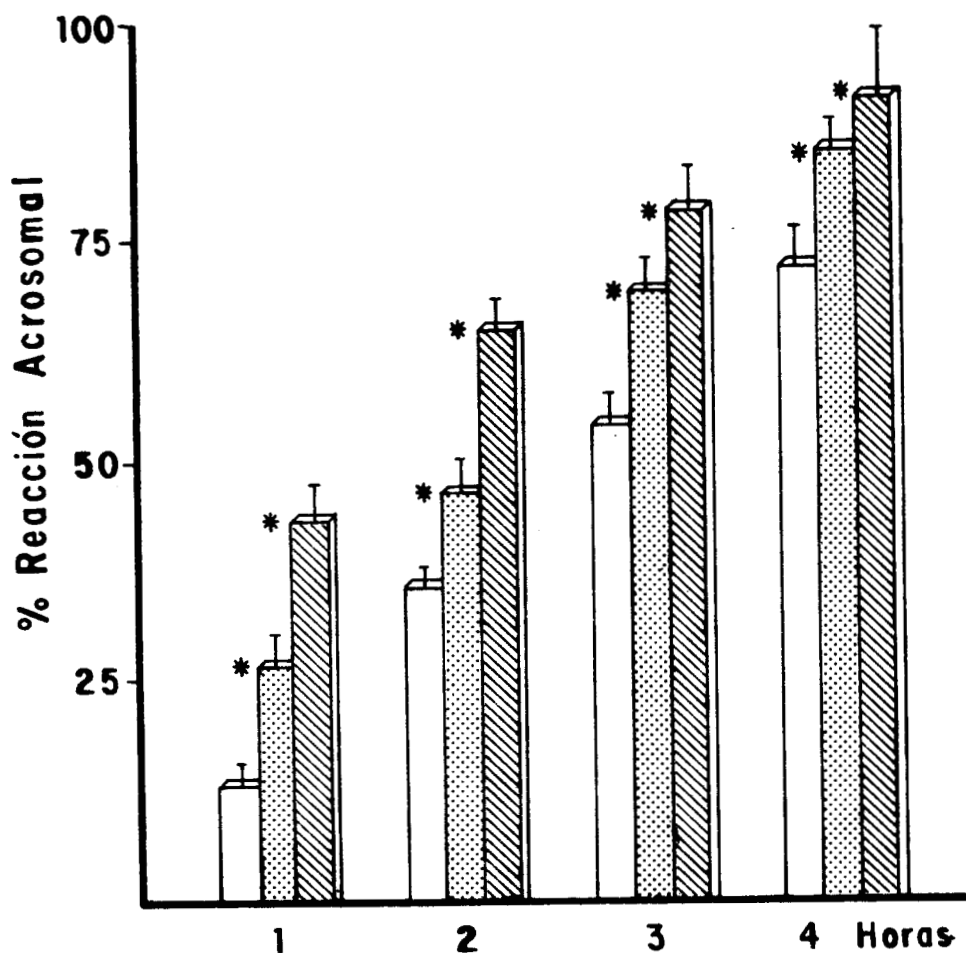





Gráfica 1. Se incubaron alícuotas de  $25 \times 10^6$  espermatozoides, durante 4 horas a  $37^\circ\text{C}$ , en un sistema no sincrónico para inducir la reacción acrosomal (70). Cada barra representa el promedio  $\pm$  desviación estandar (D.E.) de 5 experimentos.

□ control; ▨ 10  $\mu$ M de AMPc y ▩ 100  $\mu$ M de este nucleótido. El % de RA se evaluó por el método de Yanagimachi (7).

\*  $p < 0.01$  al comparar con el control.

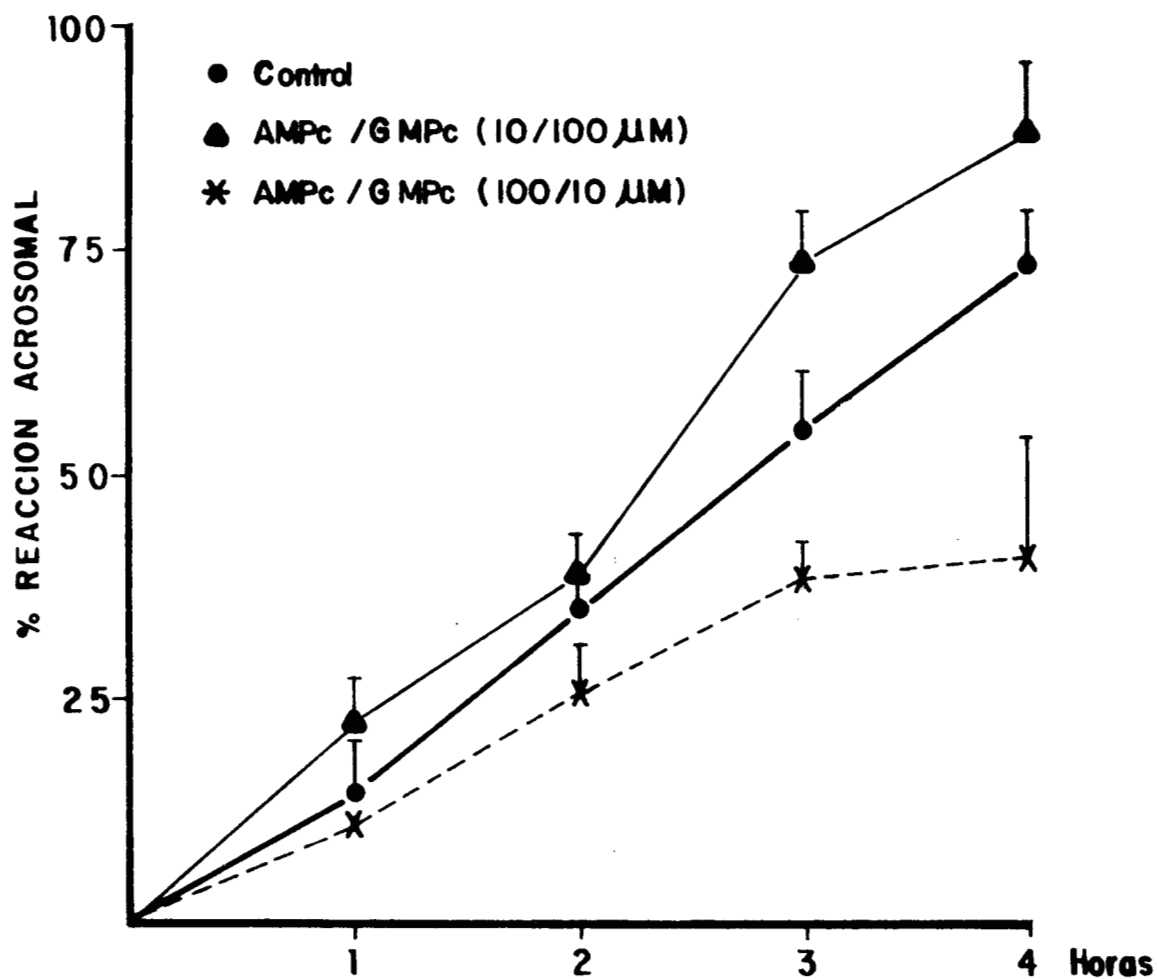
## EFECTO DE GMPc EN LA REACCION ACROSOMAL



Gráfica 2. Los espermatozoides de cobayo se incubaron en sistemas capacitantes no sincrónicos como se indica en la gráfica 1. Cada barra representa el promedio  $\pm$  D.F. de 5 experimentos.   
  control;  10  $\mu$ M de GMPc y  100  $\mu$ M de GMPc.

\*  $p < 0.01$  al comparar con el control.

## EFECTO DE AMPc/GMPc EN LA REACCION ACROSOMAL



Gráfica 3. Los espermatozoides de cobayo se incubaron en sistemas capacitantes no sincrónicos como se indica en la gráfica 1. Cada punto representa el promedio + D.E. de 5 experimentos ●—● control; ▲—▲ AMPc/GMPc (10/100 μM) y \*—\* AMPc/GMPc (100/10 μM).

Los resultados en la tercera y cuarta hora fueron significativos ( $p < 0.005$ ) al comparar con el control.

ACTIVIDAD DE ADENILIL CICLASA EN EL ACROSOMA DEL ESPERMATOZOIDE  
DE COBAYO



Figura 2. La composición fotográfica muestra: A- espermatozoides de cobayo incubados en ausencia del sustrato específico AMP-PNP (control), B- espermatozoides incubados en presencia de este sustrato. Se señalan las zonas de precipitación electrodensa que indican los sitios de actividad de adenilil cicl<sub>a</sub>sa (55,000 X) (72).

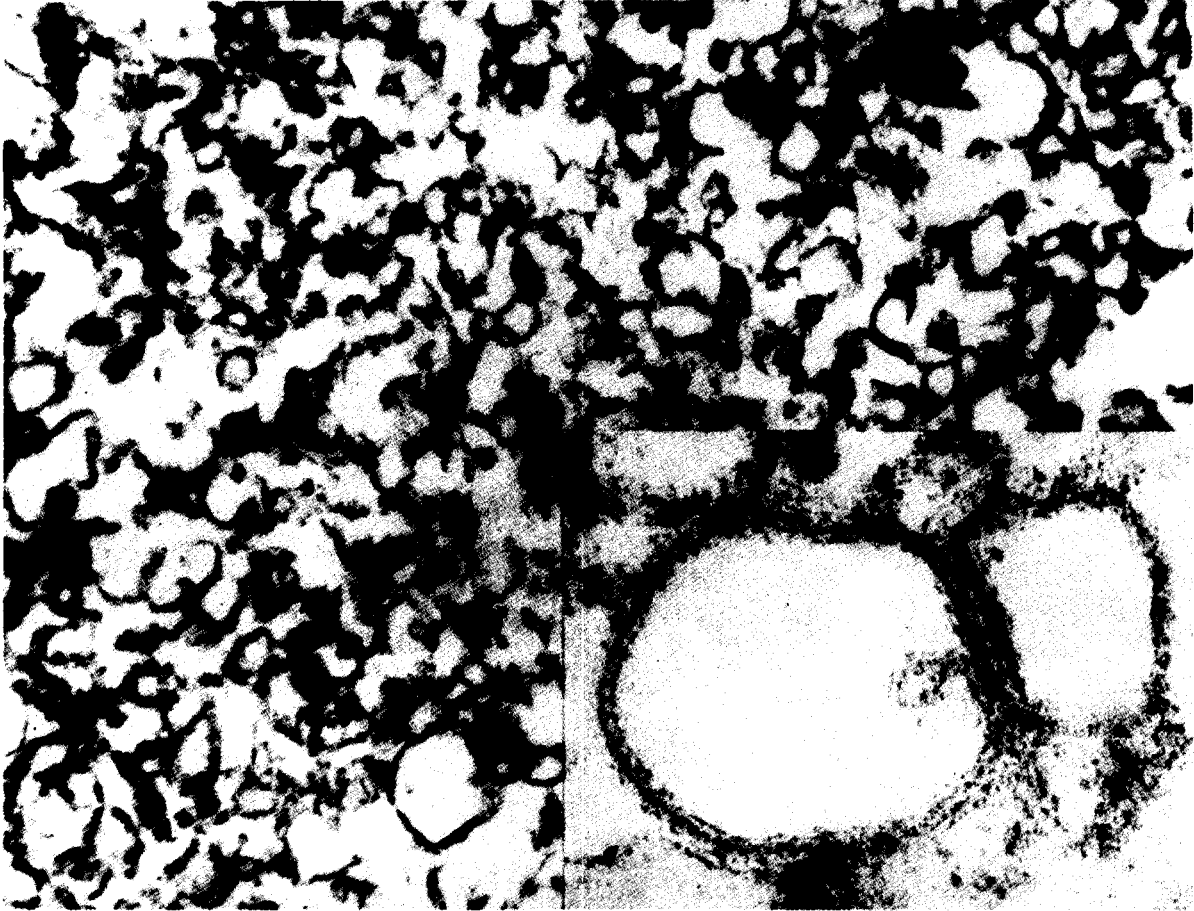


Figura 3. Fotografía de microscopia electrónica que muestra la fracción de membranas acrosomales aisladas de espermatozoides de cobayo (22,000 y 55,000 X).

## C U A D R O 1

DETERMINACION DE DIVERSAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS EN  
LAS FRACCIONES FEA Y MA OBTENIDAS DE ESPERMATOZOIDES  
DE COBAYO

ACTIVIDADES ENZIMATICAS	FRACCION ENRIQUECIDA DE ACROSOMAS (FEA)	MEMBRANAS ACROSOMALES (MA)
5'Nucleotidasa <sup>1</sup>	11.0 ± 0.98	42.4 ± 1.77
ATPasa-Ca <sup>2+</sup> <sup>1</sup>	10.9 ± 4.80	52.4 ± 17.70
ATPasa-Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> <sup>1</sup>	82.3 ± 6.03	723.3 ± 86.70
Hialuronidasa <sup>2</sup>	1089 ± 91	18.1 ± 0.51
Acrosina <sup>3</sup>	N.S.	8.5 ± 0.50

Cada dato representa el promedio ± D.E. de 10 experimentos.

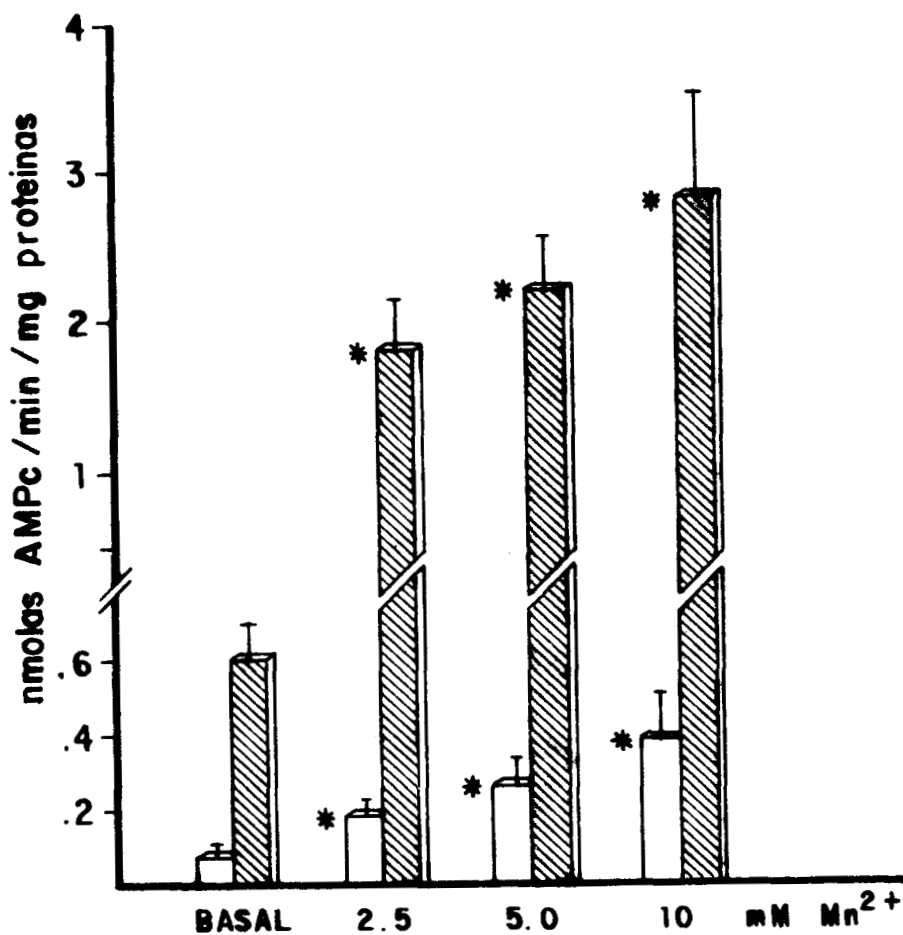
1= mmolas Pi/min/mg de proteínas



2= Unidades:una unidad es la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar la misma proporción de ácido hialurónico que 1µg de hialuronidasa estándar (84).

3= Unidades:una unidad es la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 µmola del éter etílico de la N-benzoil-L-arginina (BAEE) por minuto (30)

N.D.= No Detectable.

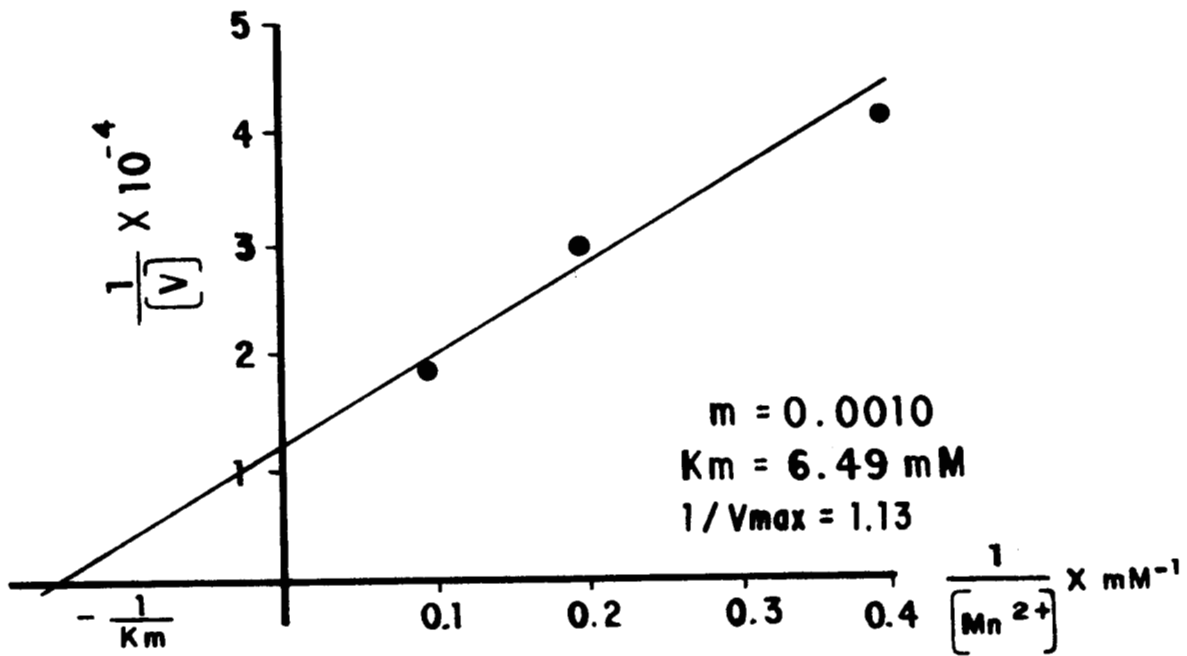


EFECTO DE  $Mn^{2+}$  EN LA ACTIVIDAD DE ADENILIL CICLASA

Gráfica 4. La actividad de adenilil ciclasa se determinó bajo las condiciones de incubación señaladas en la sección de material y métodos. Cada barra representa el promedio + D.E. de 10 experimentos. La actividad específica está expresada en nmolas de AMPc/min/mg de proteínas de FEA  y MA  incubadas en presencia de 2.5, 5 y 10 mM de  $Mn^{2+}$ , así como en ausencia de este catión divalente (basal).

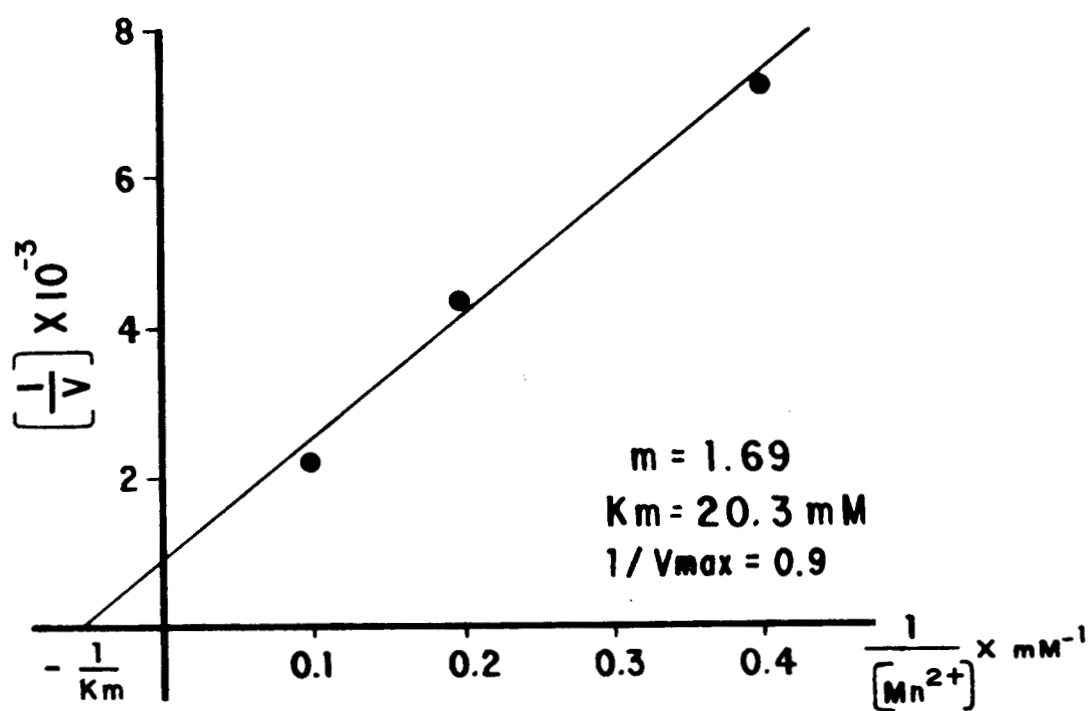
\*  $p < 0.005$  al comparar con las condiciones basales.

EFFECTO DEL  $Mn^{2+}$  EN LA ACTIVIDAD DE ADENILIL CICLASA EN LAS  
MEMBRANAS ACROSOMALES



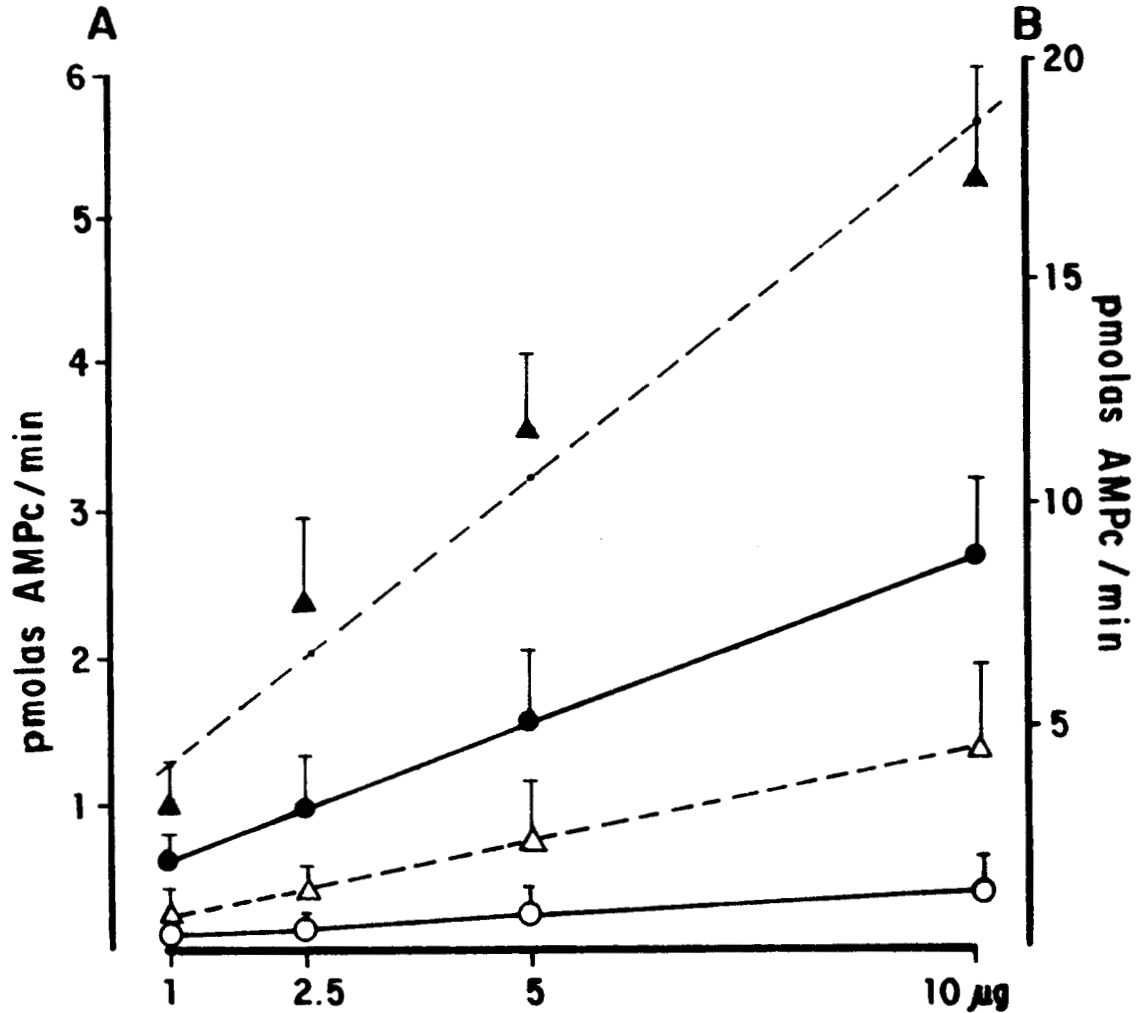
Gráfica 5. Representa la recíproca de la actividad de adenilil ciclasa contra la recíproca de las concentraciones de  $Mn^{2+}$ . La recta se ajustó mediante un análisis de regresión lineal (83).

EFFECTO DE  $Mn^{2+}$  EN LA ACTIVIDAD DE ADENILIL CICLASA EN LA FRAC\_ CION ENRIQUECIDA DE ACROSOMAS



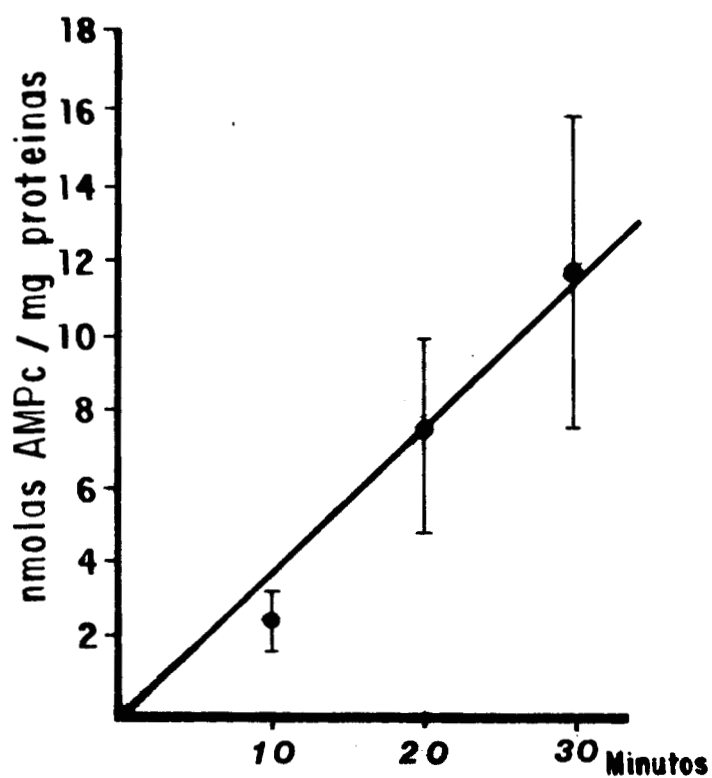
Gráfica 6. Representa la recíproca de la actividad específica versus la recíproca de la concentración de  $Mn^{2+}$ . El valor de la  $K_m$  aparente y la  $1/V_{max}$  se obtuvieron a partir del análisis de regresión (83).

EFFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ENZIMA EN LA ACTIVIDAD  
DE ADENILIL CICLASA



Gráfica 7. Cada valor representa el promedio  $\pm$  D.E. de 10 experimentos. La actividad de la enzima está expresada en nmolas AMPc/min en función de diferentes concentraciones de proteínas de FEA (escala A , ) y de MA (escala B , ), obtenidas de espermatozoides de cobayo . Estas determinaciones se realizaron tanto en condiciones basales ( , ) como en presencia de 10 mM de  $Mn^{2+}$  ( , ). Las rectas se ajustaron mediante el método de mínimos cuadrados (83).

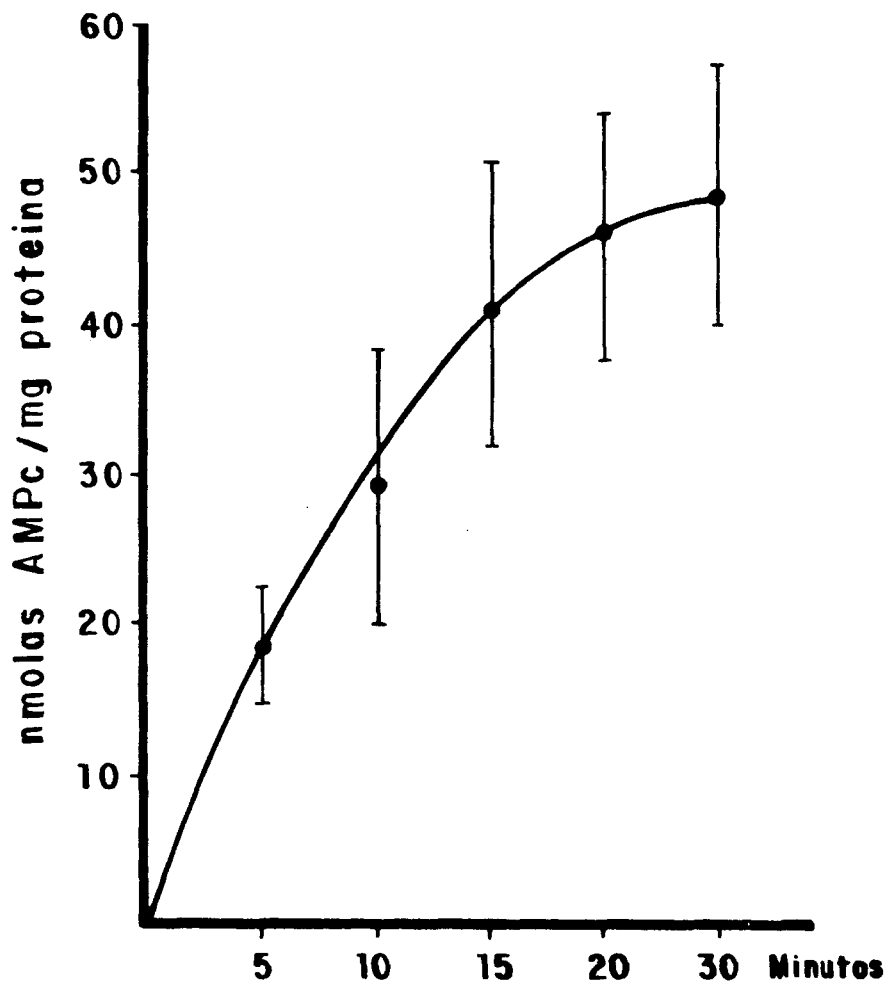
## TIEMPO DE INCUBACION Y ACTIVIDAD DE ADENILIL CICLASA



Gráfica 8. Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad de adenilil ciclasa en la fracción FEA, en presencia de 10 mM de  $Mn^{2+}$ . La actividad enzimática está expresada en nmolas de AMPc/mg de proteínas incubadas durante 10, 20 y 30 min. Los datos representan el promedio  $\pm$  D.E. de 10 experimentos

\*  $p < 0.005$  al comparar con 30 min de incubación.

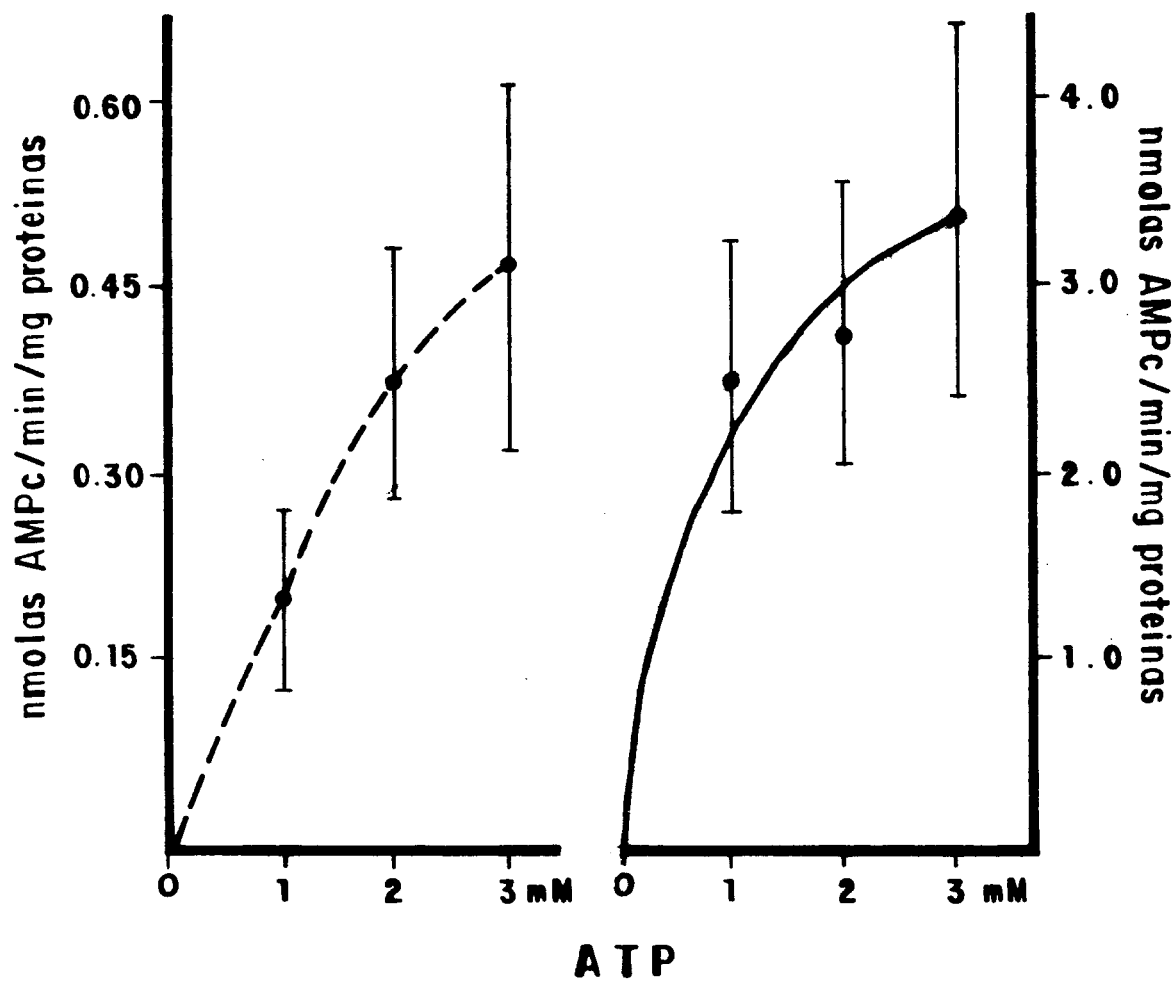
TIEMPO DE INCUBACION Y ACTIVIDAD DE ADENILIL CICLASA EN  
MEMBRANAS ACROSOMALES



Gráfica 9. Actividad de adenilil ciclasa con respecto al tiempo de incubación en la fracción MA. Los valores representan el promedio + D.E. de 10 experimentos. Esta actividad se determinó bajo las condiciones de ensayo descritas en la sección de material y métodos, utilizando 10 mM de  $Mn^{2+}$  como activador.

\*  $p < 0.005$  al comparar con 15 min de incubación.

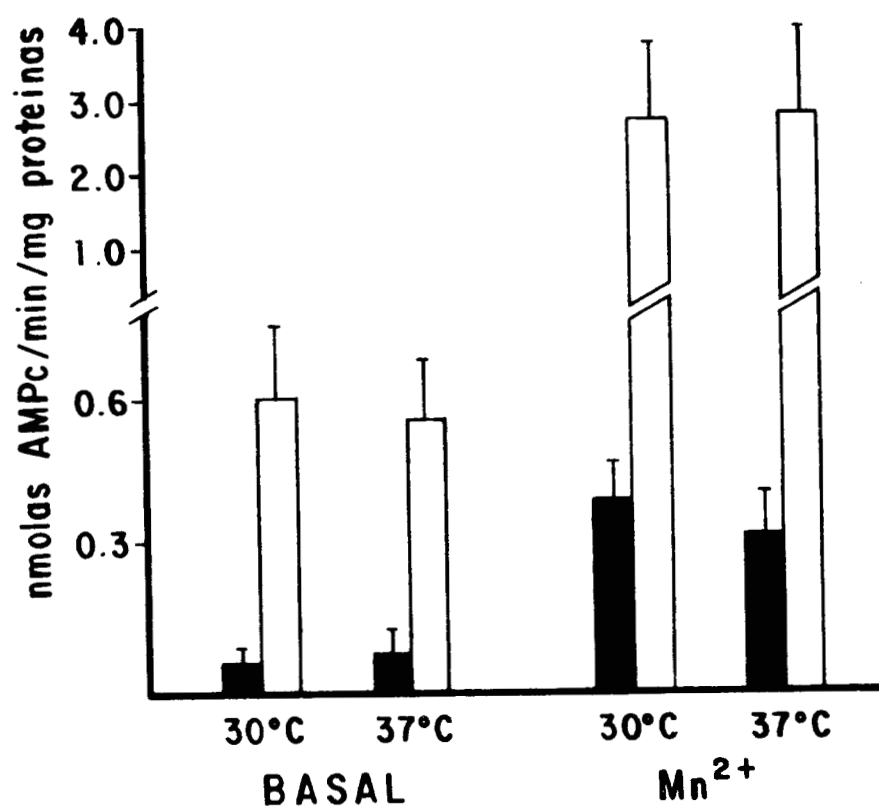
EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO EN LA ACTIVIDAD  
DE ADENILIL CICLASA



Gráfica 10. La actividad de adenilil ciclasa en las fracciones subcelulares estudiadas FEA y MA, se determinó bajo las condiciones de ensayo previamente descritas en la sección de material y métodos, en presencia de  $Mn^{2+}$  10mM. Los resultados representan el promedio  $\pm$  D.E. de 10 experimentos.

\*  $p < 0.025$  al comparar con 2 y 3 mM de ATP.

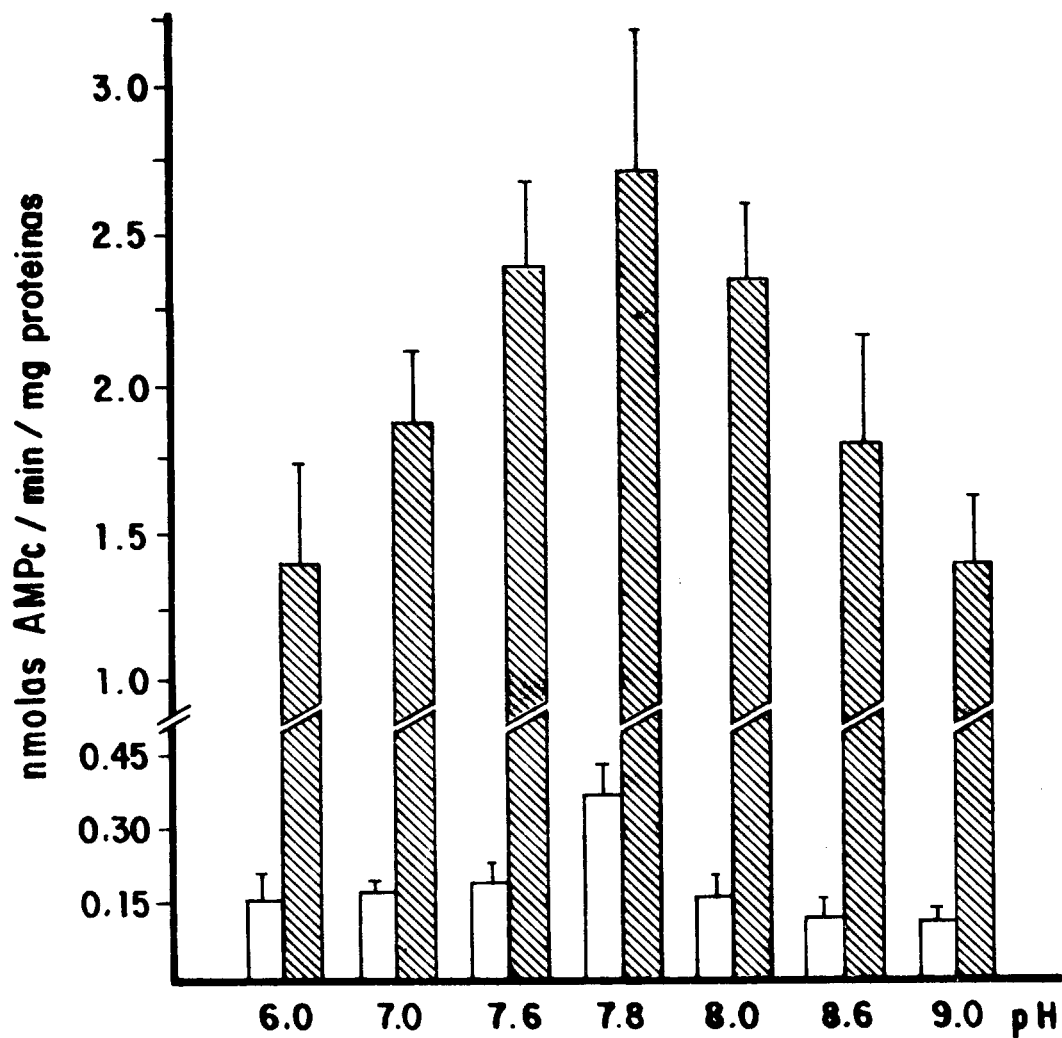
EFFECTO DE LA TEMPERATURA DE INCUBACION EN LA ACTIVIDAD  
DE ADENILIL CICLASA



Gráfica 11. Alícuotas de FEA  y de MA  fueron incubadas tanto en condiciones basales como en presencia de 10 mM de Mn<sup>2+</sup>. La actividad de adenilil ciclase está representada en nmolas de AMPc/min/mg de proteínas.



## pH y ACTIVIDAD DE ADENILIL CICLASA



Gráfica 12. El efecto del pH sobre la actividad de adenilil ciclasa, se evaluó tanto en FEA  como en MA . Los valores representan el promedio + D.E. de 10 experimentos. La actividad específica fue obtenida en presencia de 10 mM de  $Mn^{2+}$  y está expresada en nmolas de AMPc/min/mg de proteínas.

## C U A D R O 2

ACTIVIDAD ESPECIFICA DE ADENILIL CICLASA EN EL ACROSO-  
MA DEL ESPERMATOZOIDE DE COBAYO.

CONDICIONES	FRACCION ENRIQUECIDA DE ACROSOMAS ( FEA )	MEMBRANAS ACROSOMALES ( MA )
BASAL	0.0674 ± 0.0297	0.606 ± 0.140**
ACTIVADOR (Mn <sup>2+</sup> 10 mM)	0.383 ± 0.131*	2.741 ± 0.715*,**

La actividad de esta enzima está expresada en nmolas de AMPc/min/  
mg de proteínas. Los valores representan el promedio ± D.E. de 10  
experimentos.

\* p < 0.005 al comparar con la actividad basal.

\*\* p < 0.005 al comparar MA versus FEA

## VII. DISCUSSION

La utilización de diversos sistemas de capacitación in vitro han permitido a numerosos grupos de investigadores evaluar la respuesta de los espermatozoides de mamífero a las secreciones uterinas y del oviducto, o bien a los componentes presentes en el microambiente con el que el espermatozoide interactúa durante su transporte hacia el sitio de la fertilización (iones, hormonas y nucleótidos cíclicos, entre otros) (2, 85-87).

Asimismo, mediante estos sistemas de capacitación es posible inducir la reacción acrosomal ya sea en forma sincrónica o no sincrónica, dependiendo de las necesidades experimentales y por lo tanto de las condiciones de incubación de estas células, ya que si los espermatozoides son preincubados durante 2-10 horas en sistemas libres de  $\text{Ca}^{2+}$  y subsecuentemente se adiciona este catión, al término de 5-20 minutos, se induce la reacción sincrónicamente en más de un 80% de las células (36, 71, 86, 87). Por otra parte, si los espermatozoides son incubados en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  durante todo el periodo de incubación (1-10 horas), el aumento en el porcentaje de células que presentan la reacción acrosomal es pro-

gresivo en función del tiempo de incubación y consecuentemente es no sincrónico (70, 71, 76, 87). Cabe señalar que se ha considerado que el uso de sistemas no sincrónicos para inducir la reacción acrosomal permite a los espermatozoides llevar al cabo cambios bioquímicos y morfológicos similares a los fisiológicos (4, 71, 87).

Se ha propuesto que en los espermatozoides de mamífero los nucleótidos cíclicos están involucrados en la regulación de diversas expresiones de función celular tales como: metabolismo, movilidad, capacitación-reacción acrosomal y el proceso de la fertilización (44-51). Sin embargo, aún no se conoce con precisión el o los mecanismos por los cuales los nucleótidos cíclicos ejercen su efecto sobre estos procesos.

Existen numerosos estudios en los cuales se ha determinado la participación de los nucleótidos cíclicos en la regulación del metabolismo y movilidad de los espermatozoides de diversas especies de mamífero (44-47); sin embargo, la información sobre el efecto de estos nucleótidos en los procesos de capa

citación y reacción acrosomal es discreta y controversial (49-51). En este trabajo se evaluó la participación de AMPc y GMPc en la regulación de la reacción acrosomal del espermatozoide de cobayo mediante la utilización de un sistema no sincrónico para inducir la capacitación-reacción acrosomal in vitro. En las condiciones experimentales que se consideraron como control se determinó que la proporción de espermatozoides con reacción acrosomal se incrementó progresivamente con respecto al tiempo de incubación, alcanzando al final de la cuarta hora hasta 72% (gráfica 1, 2 y 3). Este comportamiento cinético de la reacción acrosomal es similar al reportado por Barros (71), quien utilizó condiciones experimentales semejantes a las de este trabajo.

Cuando se adicionó a los sistemas de incubación 10 y 100  $\mu$ M de AMPc, la proporción de células con reacción acrosomal se inhibió 30 y 40% durante la tercera y cuarta hora de incubación respectivamente. Durante las dos primeras horas de incubación no se observaron modificaciones en esta proporción (gráfica 1).

En contraste con estos resultados, Mrsny y Meizel (50) han reportado que la adición de 0.1-1.0  $\mu\text{M}$  de inhibidores de fosfodiesterasas o análogos de AMPc en sistemas de capacitación de espermatozoides de hamster estimulan la reacción acrosomal. Sin embargo, en ese estudio se utilizó un sistema sincrónico para inducir la reacción acrosomal y en consecuencia las células estuvieron expuestas tanto al nucleótido cíclico como a  $\text{Ca}^{2+}$  durante un periodo de incubación limitado. Por lo tanto, la diferencia en el efecto de AMPc sobre la reacción acrosomal podría deberse a que en el sistema de incubación no sincrónico, la interacción de los espermatozoides con estos dos compuestos durante varias horas modifique las características de la permeabilidad y fluidez de las membranas entre otros efectos (1, 6, 19, 32, 87).

Al comparar los resultados obtenidos con 10 y 100  $\mu\text{M}$  de AMPc en la inhibición de la reacción acrosomal observamos que la diferencia entre ambos resultados no es significativa; inclusive, cuando se utilizaron concentraciones mayores (hasta 1 mM) no se observaron cambios en el efecto inhibitorio. En es-

te caso el efecto de AMPc no demostró una dependencia de la concentración, a diferencia de lo reportado por Rogers y García (51), quienes determinaron en espermatozoides de cobayo que la adición de db-AMPc a un sistema de incubación no sincrónico inducen una inhibición concentración-dependencia de la reacción acrosomal. Estas diferencias podrían explicarse en base a las características de solubilidad de estos dos componentes.

Por otra parte, otros estudios realizados en espermatozoides de ratón y cobayo, incubados en sistemas capacitantes sincrónicos adicionados de análogos de AMPc o inhibidores de fosfodiesterasas, han concluido que el AMPc no modifica el % R A, aunque se ha observado consistentemente que se disminuye el tiempo de incubación necesario para que se lleve al cabo el proceso de la reacción acrosomal (48, 49).

Consideramos que, los diferentes comportamientos que presentan los espermatozoides de mamífero frente al AMP pueden deberse a diversos factores, que incluyen la utilización de diferentes concentraciones de nucleótidos o inhibidores de fosfodiesterasa,



diferentes sistemas de capacitación (sincrónico o no sincrónico), o bien, diferencias específicas de especies (44, 48-51).

Uno de los mecanismos por los cuales se sugiere que el AMPc ejerce su efecto sobre la reacción acrosomal, involucra la presencia de receptores para AMPc en la membrana plasmática del espermatozoide, aunque también participa la fosforilación de proteínas membranales inducida por este nucleótido, la modifica en las características de permeabilidad y fluidez membranar (2, 22, 44, 88).

Asimismo, se ha sugerido que el efecto de AMPc sobre la reacción acrosomal puede ser mediado también por la estimulación del metabolismo anaeróbico, ya que se ha reportado que en espermatozoides de toro incubados en presencia de inhibidores de fosfodiesterasas, se incrementan tanto la concentración intracelular de AMPc como el consumo de glucosa, eventos que se han asociado con la inhibición de la reacción acrosomal (4, 43, 44, 87).

En este trabajo, durante la evaluación del efecto del AMPc en la reacción acrosomal, se observó un incremento en la intensidad del movimiento flagelar de los espermatozoides de cobayo, en tanto que el porcentaje de células móviles permaneció constante durante el periodo de incubación de 4 horas utilizado en este estudio.

Estos resultados coinciden con estudios previos en espermatozoide de ratón, hamster y cobayo, que indican que durante la capacitación in vitro en sistemas sincrónicos en presencia de análogos de AMPc o bien de inhibidores de las fosfodiesterasas, se incrementa la intensidad del movimiento sin modificarse la proporción de células móviles (48-50).

Por el contrario, Rogers y García (51) han señalado que el porcentaje de células móviles se incrementa al incubar espermatozoides de cobayo en presencia de AMPc en sistemas no sincrónicos. Asimismo, Tash y col han determinado que el AMPc no solo modifica la intensidad de la movilidad flagelar, sino que también estimula la proporción de células móviles y consecuentemente la velocidad espermática (46, 47).

Por lo tanto, podemos señalar que se requieren más estudios para elucidar la causa de los diferentes comportamientos de los espermatozoides frente a este nucleótido.

Por otra parte, los resultados obtenidos al adicionar 10 y 100  $\mu\text{M}$  de GMPc a los sistemas de capacitación nos indicaron que este nucleótido no modificó las características de la movilidad espermática bajo las condiciones experimentales utilizadas, lo cual es consistente con observaciones previas realizadas por otros investigadores (44, 89). Por tanto, podemos señalar que GMPc no parece participar en la regulación de la propagación de la onda flagelar del espermatozoide de cobayo.

Sin embargo, en relación al efecto de GMPc sobre la reacción acrosomal, determinamos que las concentraciones de 10 y 100  $\mu\text{M}$  de este nucleótido estimularon significativamente este parámetro en todos los periodos de incubación estudiados. El efecto activador de GMPc fue dependiente tanto del tiempo de incubación como de la concentración utilizada (gráfica 2).

Por otra parte, al incubar los espermatozoides de cobayo simultaneamente en presencia de AMPc y GMPc, se observaron cambios en la reacción acrosomal que fueron dependientes del predominio de uno u otro nucleótido cíclico. Cuando se tuvo predominio de AMPc, la proporción de células con reacción acrosomal fue menor al término de la tercera y cuarta horas de incubación en relación al control; sin embargo, los resultados obtenidos no fueron significativamente diferentes de los obtenidos con AMPc solamente (gráfica 3).

Por el contrario cuando la relación AMPc/GMPc mostró predominio de la concentración de GMPc, el % R A se incrementó con relación a los valores obtenidos en el control (gráfica 3). Este aumento solo se observó durante la tercera y cuarta horas de incubación, a pesar de que GMPc tuvo efecto estimulatorio durante todo el periodo de incubación cuando se utilizó por separado. Estos resultados sugieren la participación de mecanismos sutiles de regulación en la reacción acrosomal en relación a la interrelación de ambos nucleótidos.

Un efecto similar ha sido reportado por el grupo de Santos-Sacchi (89), quien señaló que la adición de 10 mM de GMPc a los espermatozoides de cobayo, incubados durante una hora en sistemas capacitantes no sincrónicos, indujo un incremento de hasta 18.5 veces en el % R A. Sin embargo, la concentración del nucleótido utilizado fue hasta 100 veces mayor que la empleada en nuestro trabajo. Además es importante comentar que el % R A obtenido por este grupo en la primera hora de incubación fue de 0.69% en tanto que en la cuarta hora solo una discreta proporción de células (6.6%) presentó reacción acrosomal (89). En consecuencia, la cinética de la reacción acrosomal obtenida por este grupo de investigadores fue considerablemente diferente de la determinada en este estudio, en el cual en la primera hora de incubación se obtuvo un 13% R A y hasta un 72% R A en la cuarta hora de incubación (gráficas 1, 2 y 3). Por lo tanto, consideramos que con la finalidad de tener resultados comparables, es necesario unificar los criterios para establecer las condiciones óptimas de incubación.

Las evidencias obtenidas en nuestro laboratorio indican que en la secreción uterina de la coneja existe una concentración precisa de AMPc, asociada con una concentración menor de GMPc, lo cual permite sugerir que esta relación AMPc/GMPc participa en la etapa inicial de la capacitación del espermatozoide que se sucede en el microambiente uterino (2). Por otra parte, sabemos que en la secreción del oviducto existe un predominio de GMPc en relación a la concentración de AMPc (2), aspecto que sugiere que dicha relación permite se exprese la reacción acrosomal del espermatozoide de mamífero.

En las células somáticas se ha propuesto una hipótesis para explicar la modulación de la exocitosis por nucleótidos cíclicos. Esta hipótesis implica que la relación AMPc/GMPc con predominio de GMPc induce la exocitosis, en tanto que el predominio de AMPc inhibe dicho proceso (51, 90). Inclusive, se ha sugerido que el mecanismo por el cual estos segundos mensajeros regulan la exocitosis, involucra la fosforilación y desfosforilación de proteínas contráctiles tales como actina y tubulina, entre otras (22, 46, 70).

Debido a la similitud de origen y funcionalidad entre el acrosoma, los lisosomas y los gránulos secretorios así como la reciente demostración de la presencia de actina y tubulina en el acrosoma del espermatozoide de mamífero (28, 70), podemos sugerir que la iniciación de la liberación de las actividades hidrolíticas contenidas en el acrosoma está asociada con el ensamble y desensamble de microtúbulos y microfilamentos, regulados por la relación diferencial precisa de AMPc/GMPc.

Ahora bien, entre las actividades enzimáticas que participan en la regulación de la concentración de AMPc se encuentra la adenilil ciclasa, por lo que la estrategia de este estudio implicó la determinación de la presencia de esta enzima en el espermatozoide de cobayo, mediante un método citoquímico utilizando el AMP-PNP, que es considerado un sustrato específico para el sistema adenilil ciclasa y que nos permitió detectar los sitios de actividad de esta enzima (72).

De acuerdo con los resultados obtenidos, los precipitados electrodensos que demarcan las regiones de

los sitios de actividad de esta enzima, fueron más ostensibles en la membrana plasmática que cubre el acrosoma, particularmente en la cara interna de esta entidad (figura 2).

Resultados similares han sido reportados por Peterson y col (91), quienes utilizando espermatozoides de cerdo observaron que la actividad de adenilil ciclasa está asociada, fundamentalmente, a la cara interna de la membrana plasmática. Asimismo, en ese estudio también se determinó que esta enzima se presenta en la superficie interna de las vesículas obtenidas de espermatozoides capacitados in vitro. Por lo tanto, podemos sugerir que este sistema enzimático está involucrado en la regulación de la concentración intraacrosomal de este nucleótido.

Cabe señalar que en las células somáticas se ha demostrado, mediante la utilización de técnicas citológicas, que la actividad de adenilil ciclasa se encuentra asociada principalmente a la cara externa de la membrana plasmática, aunque también se ha observado en los gránulos secretorios presentes en las



células  $\beta$  de los islotes de Langerhans (72, 92).

En consecuencia, la importancia fisiológica que tiene la localización de esta enzima en la cara interna de la membrana plasmática periacrosomal en el espermatozoide, aún se desconoce.

El análisis de las características bioquímicas del sistema adenilil ciclasa implicó la utilización tanto de membranas acrosomales (MA), como de una fracción enriquecida de acrosomas (FEA). Por lo tanto, fue de la mayor importancia evaluar la pureza de estas fracciones subcelulares mediante la determinación de la actividad de enzimas marcadoras de membranas, las cuales nos indicaron que en FEA las actividades de ATPasa dependiente de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , ATPasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y 5'Nucleotidasa, fueron significativamente menores que las determinadas en MA. Por otra parte, las actividades de hialuronidasa y acrosina, enzimas solubles principalmente, se localizaron predominantemente en la fracción FEA (matriz y membranas acrosomales), siendo su actividad baja o indetectable en la fracción MA (cuadro 1). Estos aspectos, conjuntamente con el análisis de microscopía electrónica de transmisión de la fracción

MA (figura 3), permiten señalar que los procedimientos utilizados para obtener y purificar las membranas acrosomales del espermatozoide de cobayo fueron adecuados.

Ahora bien, a pesar de que la actividad de adenilil ciclase se ha detectado en los espermatozoides de diversas especies de mamífero, no existe aún uniformidad de criterios para definir cuales son las condiciones adecuadas para evaluar bioquímicamente a esta enzima (58, 68, 69, 72). Por lo tanto, estudiamos algunas características bioquímicas de esta actividad en la región acrosomal.

De acuerdo con nuestros resultados y los obtenidos por otros investigadores (68, 91, 93, 94) esta enzima es dependiente de la presencia de  $Mn^{2+}$  para la formación de AMPc (gráfica 4). En este trabajo, tanto en la fracción FEA como MA incubadas en presencia de 10 mM de este catión divalente, la actividad de adenilil ciclase se incrementó hasta 5 veces en relación a la observada bajo condiciones basales; siendo ostensiblemente mayor la actividad en MA en comparación con FEA, lo cual nos permite señ

lar que la actividad de adenilil ciclasa fue predominantemente membranaral.

Este efecto activador de  $Mn^{2+}$  fue observado también por Peterson y col (91), quienes demostraron un incremento de hasta 5 y 20 veces en la actividad de adenilil ciclasa en los espermatozoides de humano y cerdo, respectivamente, incubados en presencia de 10 mM de  $Mn^{2+}$ . Otros estudios han determinado que la actividad de adenilil ciclasa se incrementó 15 y 50 veces en los espermatozoides de toro y mono rhesus respectivamente, en presencia de 25 mM de este catión divalente (58, 93).

Es importante señalar que la  $K_m$  de 6.49 mM obtenida para  $Mn^{2+}$ , en nuestro trabajo, representa una concentración elevada ya que mediante el análisis de energía por dispersión de rayos X y microscopía electrónica, se ha determinado que en las estructuras intracelulares de los espermatozoides humanos solo se presentan trazas de este catión divalente (95). Sin embargo, se debe considerar la posibilidad de que este catión se encuentre compartamentalizado, lo cual permitiría explicar que en las membra

nas del espermatozoide se localicen concentraciones elevadas de  $Mn^{2+}$ .

El mecanismo por el cual  $Mn^{2+}$  activa al sistema adenilil ciclasa en el espermatozoide de mamífero no se conoce con precisión, se ha sugerido que este catión divalente es capaz de incrementar la accesibilidad del sustrato (ATP) a la enzima, al formarse un complejo  $Mn^{2+}$ -ATP (80, 92). Por otra parte, este catión divalente también parece actuar estimulando directamente la subunidad catalítica (C) de la adenilil ciclasa (62, 93).

En relación a la dependencia de este sistema enzimático a cationes divalentes, se ha reportado que los iones  $Co^{2+}$  y  $Zn^{2+}$  tienen un efecto activador de la adenilil ciclasa del espermatozoide sumamente discreto, en tanto que otros cationes como  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  activan a este sistema enzimático solo un 10 a 15% en relación al efecto activador de  $Mn^{2+}$  (79, 93).

Ahora bien, la actividad específica de esta enzima en la fracción FEA fue dependiente de la concentración de ATP; sin embargo en las membranas acrosoma-

les esta actividad no se modificó en respuesta a las diferentes concentraciones de sustrato utilizadas (1, 2 y 3 mM de ATP) (gráfica 10). Es complejo explicar la razón de este comportamiento diferente de la actividad de adenilil ciclasa en las fracciones subcelulares estudiadas, ya que en los espermatozoides de diversas especies de mamífero, se ha de mostrado que la actividad de adenilil ciclasa es de pendiente de la concentración del sustrato en un in tervalo de concentraciones de 0.5-10 mM de ATP e in clusive se ha establecido una  $K_m$  aparente para ATP en el intervalo 1-4 mM (68, 69, 91).

En un sistema enzimático los principales factores por los cuales no se puede obtener linealidad son: degradación del sustrato, inactivación de la enzima y degradación del producto de reacción, entre otros (80, 81). Por lo tanto, en este estudio adicionamos un sistema de regeneración de ATP: piruvato cinasa/fosfoenol pirúvico, para mantener constante la concentración del sustrato; albúmina, para estabili zar y proteger la actividad enzimática y un inhibidor de fosfodiesterasas (SQ 20,009), para evitar la hidrólisis del AMPc formado durante la reacción

(80, 81, 96).

Bajo estas condiciones fue posible obtener una actividad lineal de adenilil ciclasa en las fracciones FEA y MA en el intervalo de concentraciones de proteínas de 1-10  $\mu\text{g}/\text{sistema}$ .

Por otra parte, este comportamiento lineal fue observado también en el periodo de incubación de 5-15 min en la fracción MA y de 30 min en FEA (gráficas 8 y 9). Estos resultados son consistentes con lo reportado por otros investigadores, quienes utilizando tanto espermatozoides de diversas de mamífero, como membranas plasmáticas aisladas de estas células, han determinado que se requieren tiempo de incubación cortos para la evaluación bioquímica de la actividad de adenilil ciclasa (58, 68, 69, 73).

Diversos estudios realizados en células somáticas señalan que la temperatura óptima de incubación para el sistema adenilil ciclasa es de  $37^{\circ}\text{C}$  (80, 81, 97); sin embargo en los espermatozoides solo se ha estudiado la actividad de esta enzima utilizando la temperatura de  $30^{\circ}\text{C}$  (58, 68, 69, 73, 79). Por lo

tanto, se consideró necesario estudiar el comportamiento de esta enzima en las fracciones FEA y MA utilizando ambas temperaturas de incubación, encontrándose que no existen diferencias en la actividad de adenilil ciclasa determinada en FEA y MA al utilizar 30 ó 37°C (gráfica 11) lo cual es interesante ya que en las células somáticas el incremento en la temperatura puede modificar la velocidad de reacción y consecuentemente la actividad enzimática (80, 81, 97).

Por otra parte, al estudiar el comportamiento de esta enzima en el intervalo de pH 6.0-9.0 se determinó que la actividad máxima se presenta a pH 7.8 en ambas fracciones estudiadas (gráfica 12). Este comportamiento del sistema adenilil ciclasa es similar al observado por otros investigadores en espermatozoide de cobayo, toro y humano, en donde determinaron que el pH óptimo fue de 7.6-7.9 (58, 73, 79). Por lo tanto, podemos señalar que la actividad de esta enzima es los espermatozoides de mamífero requiere de un pH discretamente alcalino, para que exprese su máxima actividad.

En base a nuestros resultados, podemos señalar que en el acrosoma de los espermatozoides de cobayo, la actividad de adenilil ciclase se encuentra fundamentalmente asociada a la fracción de membranas, ya que en esta fracción la actividad fue hasta 9 veces mayor que la determinada en la fracción FEA (cuadro 2). Asimismo, se determinó que en la fracción MA la actividad específica fue de 2.74 nmolas de AMPc/min/mg de proteínas, la cual representa un valor cercano a las 3.16 nmolas AMPc/min/mg de proteínas por Stengel y col (94) para la actividad de adenilil ciclase en las membranas del espermatozoide de toro. Sin embargo, es importante señalar la actividad específica de la adenilil ciclase en los espermatozoides de mamífero presenta extraordinarias diferencias que parecen específicas de especie, ya que se han reportado valores de actividad tan bajos como 0.248 nmolas AMPc/min/mg de proteína en la membrana del espermatozoide humano, y tan elevada como 13.9 nmolas AMPc/min/mg de proteínas en el espermatozoide de cerdo (58, 68, 69, 91).

Debe considerarse también que los diferentes procedimientos fisico-bioquímicos empleados tales como:



congelación-descongelación, choque frío, sonicación, homogeneización, uso de detergentes, entre otros, con la finalidad de estudiar a la enzima ya sea en los espermatozoides completos o bien en sus fracciones subcelulares aisladas (58, 68, 91, 98), pueden modificar las características intrínsecas de la membrana y ser parte de las causas de estas variaciones. No obstante estas diferencias, puede señalarse que la actividad específica de adenilil ciclasa en el espermatozoide es considerablemente elevada, en relación a la detectada en otras estirpes celulares (44, 59, 60).

El sistema adenilil ciclasa del espermatozoide de mamífero presenta características particulares que lo hacen diferente del de las células somáticas, ya que en el espermatozoide es insensible a hormonas, guanin nucleótidos, toxina del cólera y NaF, compuestos que activan a este sistema enzimático al través de su interacción con la subunidad N (44, 58, 65, 68, 69, 93). Por lo tanto, se han propuesto mecanismos alternos de regulación, entre los que se ha mencionado la participación de cationes divalentes como es el caso de  $Mn^{2+}$ , el cual es capaz de

activar a esta enzima vía la subunidad catalítica (68, 93). Por otra parte, se ha sugerido que  $\text{Ca}^{2+}$  sea un regulador de este sistema enzimático (49), aunque el mecanismo por el cual este catión activa al sistema adenilil ciclasa del espermatozoide esta en vías de ser elucidado (49, 79).

El descubrimiento de la proteína reguladora de  $\text{Ca}^{2+}$  denominada calmodulina, ha generado nuevas perspectivas para estudiar la regulación del sistema adenilil ciclasa en el espermatozoide de mamífero, ya que se ha demostrado que esta proteína regula múltiples sistemas enzimáticos, incluyendo a la adenilil ciclasa en las células de eucariotes (99, 100).

## VIII. CONCLUSIONES

La adición de concentraciones micromolares de nucleótidos cíclicos a los sistemas de capacitación no sincrónicos, permitió determinar que AMPc inhibió significativamente el porcentaje de reacción acrosomal en el espermatozoide de cobayo, en tanto que la adición de GMPC a estos sistemas, indujo un aumento en esta proporción. Cabe señalar que sólo con GMPC el efecto observado fue dependiente de la concentración .

Se determinó que la adición conjunta de AMPc y GMPC (utilizando una concentración 10 veces mayor de AMPc en relación a GMPC) simulando la relación AMPc/GMPC existente en las secreciones uterinas, inhibió el % R A. Asimismo, al emplear esta estrategia metodológica utilizando un predominio de GMPC en analogía a la relación AMPc/GMPC que prevalece en la secreción del oviducto, sitio donde ocurre fisiológicamente la reacción acrosomal, se obtuvo un incremento mayor en el % R A.

Por lo antes expresado, proponemos que en la regulación de la reacción acrosomal participan concentra-

ciones críticas de AMPc y GMPc, presentes en el microambiente del aparato reproductor femenino con el que esta gameta interacciona. Sin embargo, se requieren más estudios para conocer el o los mecanismos moleculares por los cuales estos nucleótidos regulan los procesos de fusión y vesiculación membranal, asociados con la liberación y/o secreción de las enzimas hidrolíticas contenidas en el acrosoma.

Por otra parte, al estudiar mediante citoquímica al sistema adenilil ciclasa del espermatozoide de cobayo, observamos que esta enzima se localiza preferentemente en la cara interna de la membrana plasmática periacrosomal del espermatozoide de cobayo. Esta ubicación es diferente de la observada en otras células somáticas, en donde se ha demostrado que la adenilil ciclasa se localiza en la cara externa de la membrana plasmática. No obstante, podemos sugerir que esta enzima participa en la regulación de la concentración intraacrosomal de AMPc.

El estudio de actividades enzimáticas consideradas marcadoras de membranas y matriz acrosomal, así como el estudio de microscopía electrónica, indicaron que

los procedimientos empleados para aislar las membranas acrosomales y la fracción enriquecida de acrosomas del espermatozoide de cobayo fueron adecuadas.

En estas fracciones subcelulares se corroboró que la actividad de adenilil ciclase está asociada fundamentalmente a la fracción de membranas acrosomales.

Asimismo, se constató que en presencia de  $Mn^{2+}$  esta enzima es hasta 5 veces más activa que en presencia de  $Mg^{2+}$ , lo cual señala que  $Mn^{2+}$  es un activador del sistema adenilil ciclase en el espermatozoide de mamífero, No se conoce la implicación fisiológica de  $Mn^{2+}$  en la regulación de esta enzima, por lo que es necesario realizar estudios dirigidos a elucidar la compartimentalización de este catión durante la capacitación-reacción acrosomal.

Se determinó que la adenilil ciclase presentó un comportamiento lineal tanto en función de concentraciones bajas de proteínas (menores de 10  $\mu$ g/sistema), como de tiempos cortos de incubación (menores de 15 min), lo cual sugiere una velocidad de reacción rápida.

En la fracción de membranas acrosomales no observamos diferencias significativas en la actividad de adenilil ciclase al utilizar diferentes concentraciones de ATP, en el intervalo de 1-3 mM, o bien al incubar a las fracciones subcelulares estudiadas a temperaturas de 30 y 37°C, lo cual es contrastante con el concepto de que estas variables modifican la velocidad de reacción, así como la actividad específica de esta enzima.

Se estableció que el pH óptimo para determinar la actividad de esta enzima es de 7.8, lo cual es congruente con lo reportado en la literatura, en donde se ha señalado que se obtiene la mayor actividad a pH ligeramente alcalino.

Finalmente, para conocer los mecanismos moleculares que regulan el proceso de la reacción acrosomal del espermatozoide de mamífero al través de los nucleótidos cíclicos, consideramos que una vez establecidas las condiciones óptimas para determinar la actividad de adenilil ciclase, es necesario realizar estudios dirigidos a establecer los mecanismos de regulación de este sistema enzimático.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS



1. Bedford JM (1970). Sperm capacitation and fertilization in mammals. Biol Reprod Suppl 2:128-158
2. Reyes A, Chavarria ME, Rosado A (1980). Interference with spermatozoa capacitation. En: Clinics in Andrology, Cunningham GR, Schill WB, Hafez ESE (eds). Martinus Nihjoff, Publisher. The Hague , Vol 5: Regulation of Male Fertility p. 132-146
3. Bedford JM (1983). Significance of the need sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals . Biol Reprod 28:108-120
4. Yanagimachi R (1981). Mechanism of fertilization in mammals. En: Fertilization and Embryonic Developments in vitro. Mastroianni L, Biggers JD (eds). Plenum Press, New York p. 81-182
5. Farooqui AA (1983). Biochemistry of sperm capacitation . Int J Biochem 15:464-468

6. Langlais J, Roberts KD (1985). A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosoma reaction of mammalian spermatozoa. Gamete Res 12: 183-224
  
7. Oliphant G (1970). Removal of sperm bound seminal plasma components as a prerequisite to induction of the acrosomal reaction. Fertil Steril 27: 28-38
  
8. Reyes A, Oliphant G, Brackett BG (1975). Partial purification and identification of a reversible decapacitation factor from rabbit seminal plasma Fertil Steril 126: 148-157
  
9. Reyes A, Mercado E, Rosado A, (1975). Inhibition of capacitation and of the fertilizing capacity of rabbit spermatozoa by blocking membrane sulfhydryl groups. En: Recent Advance in Human Reproduction. Campos de la Paz A, Drill VA, Hayashi M, Rodriguez W, Schally A (eds). Amsterdam. Excerpta Medica p. 322-324

10. Rosado A, Velazquez A, Lara-Ricalde R (1973).  
Cell polarography. II: Effect of neuraminidase  
and follicular fluid upon the surfase characte  
ristics of human spermatozoa. Fertil Steril  
24: 349-354
11. Srivastava PN, Farooqui AA (1980). Studies of  
neuraminidase activity of the rabbit endome-  
trium . Biol Reprod 22: 858-863
12. Kinsey WH, Koehler JK (1978). Cell surfase  
changes associated with in vitro capacitation  
of hamster sperm. J Ultraestructur Res 64: 1-  
13
13. Gordon M, Dandekar PV, Bartoszewicz W (1974).  
Ultrastructural localization of surfase recep  
tor for concanavalin A on rabbit spermatozoa.  
J Reprod Fertil 36: 211-214.
14. Fleming ND, Kosower NS, Yanagimachi R (1982).  
Promotion of capacitation of guinea pig sper-  
matozoa by membrane mobility agent, A<sub>2</sub>C, and

inhibition by the disulfide-reducing agent, DDT.  
Gamete Res 5: 19-33

15. Friend DS, Orci L, Perrelet A, Yanagimachi R (1977). Membrane particle changes attending the acrosome reaction in guinea pig spermatozoa. J Cell Biol 74: 561-577
16. Demel RA, De Kruff B (1976). The function of sterols in membranes. Biochim Biophys Acta 457: 109-132
17. Shinitzky M (1978). An efficient method for modulation of cholesterol level in cell membranes. FEBS Letter 85: 317-320
18. Davis BK, Gergely AF (1979). Studies on the mechanism of capacitation: Changes in plasma membrane proteins of rat spermatozoa during incubation in vitro. Biochem Biophys Res Commun 88: 613-618

19. Singh JP, Babcock DF, Lardy MA (1978). Increased calcium ion influx is a component of capacitation of spermatozoa. *Biochem J* 172: 549-556
20. Davis BK (1976). Inhibitory effect of synthetic phospholipid vesicles containing cholesterol on the fertilizing capacity of rabbit spermatozoa. *Proc Soc Biol Med* 152: 257-261
21. Langlais J, Plante L, Bleau G, Chopdelaine A, Roberts KD (1982). Metabolism of lysophosphatidyl-choline in relation to sperm capacitation. *Fertil Steril* 38: 135-136
22. Delgado NM, Huacuja L, Pancardo RM, Merchant H, Rosado A, (1976). Changes in the protein conformation of human spermatozoal membranes after treatment with cyclic 3',5'-monophosphate and human follicular fluid. *Fertil Steril* 27: 413-420.
23. Yanagimachi R, Usui NS (1974). Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. *Exp Cell Res* 89:

161-174

24. Cummins JM (1982). Hyperactivated motility patterns of ram spermatozoa recovered from oviducts of mated ewes. *Gametes Res* 6:53-63
25. Hicks JJ, Martínez-Manautou J, Rosado A (1972). Metabolic changes in human spermatozoa related to capacitation. *Fertil Steril* 23: 172-179
26. Elliot M, Higgins JA (1983). Capacitation and the acrosome reaction increase the availability of surfase aminophospholipids for labeling by trinitrobenzene sulphate. *Cell Biol Int Rep* 7: 1091-1096
27. Meizel S (1984). The importance of hydrolytic enzymes to an exocytotic event the mammalian sperm acrosome reaction. *Biol Reprod* 59: 125-157
28. Hartree EF (1975). The acrosome-lysosome relationship. *J Reprod Fertil* 44: 125-128

29. Plattner H (1981). Membrane behaviour during exocytosis. *Cell Biol Int Reprod* 5: 435-459
30. Parrish RF, Polakosky KL (1979). Mammalian sperm proacrosin-acrosin system, *Int J Biochem* 10: 391-395
31. Perreault SD, Zirkin BR, Roger BJ (1982). Effect of trypsin inhibitors on acrosome reaction of guinea pig spermatozoa. *Biol Reprod* 26: 343-351
32. Shams BG, Harris RAP (1981). Production, characterization, and use of ionophore-induced, calcium-dependent acrosome reaction in ram spermatozoa. *Gamete Res* 4: 407-432
33. Llanos MN, Lui CW, Meizel S (1982). Studies of phospholipase A<sub>2</sub> related to the hamster sperm acrosome reaction. *J Exp Zool* 221: 107-117
34. Dravland JE, Meizel S (1982). The effect of inhibitors of trypsin and phospholipase A<sub>2</sub>

- on the penetration of zona pellucida-free hamster eggs by acrosome reacted sperm. J Androl 3: 388-395
35. Ono K, Yanagimachi R, Huang TTF (1982). Phospholipase A of guinea pig spermatozoa: Its preliminary characterization and possible involvement in the acrosome reaction. Devel Growth Differen 24: 305-310
36. Martinez R, García R, Rabago M, Hernandez O, Rosado A (1986). Subcellular distribution of phospholipase A<sub>2</sub> and ATPases during capacitation and acrosome reaction in guinea pig spermatozoa. Biol Reprod (en prensa)
37. Srivastava PN, Brewer JM, White RAJr (1982). Hydrolysis of p-nitrophenylphosphoryl-choline by alkaline phosphatase and phospholipase C from rabbit sperm acrosome. Biochem Biophys Res Commun 108: 1120-1125



38. Mitchell RH (1982). Is Phosphatidylinositol really out of calcium gate ?. Nature 296: 492-493
39. Working PK, Meizel S (1982). Preliminary characterization of  $Mg^{2+}$ -ATPase in hamster sperm acrosome reaction. Biochem Biophys Res Commun 104: 1060-1065
40. Working PK, Meizel S (1983). Correlation of increased acrosomal pH with the hamster sperm acrosome reaction. J Exp Zool 227: 97-107
41. Mersanyi RJ, Meizel S (1981). Potassium ion influx and  $Na^+, K^+$ -ATPase activity are required for the hamster sperm acrosome reaction. J Cell Biol 91: 77-82
42. Gordon M, Dandekar PV, Eager PR (1978). Identification of phosphatases on the membranes of guinea pig sperm. Anatomical Record 191: 123-134

43. Casciere M, Amann RP, Hamerstedt RH (1976).  
Adenine nucleotide changes at initiation of  
bull sperm motility. J Biol Chem 251: 787-  
793
44. Garbers DL, Kopf GS (1980). The regulation  
of spermatozoa by calcium and cyclic nucleo-  
tides. Adv Cyclic Nucleotide Res 13: 251-306
45. Hoskins DD, Hall ML, Munsterman D (1975).  
Induction of motility in immature ovine sperm  
by cyclic AMP, phosphodiesterase inhibitors  
and seminal plasma. Biol Reprod 13: 168-176
46. Tash JS, Means AR (1982). Regulation of pro-  
tein phosphorylation and motility of sperm by  
cyclic adenosine monophosphate and calcium.  
Biol Reprod 26: 745-763
47. Tash JS, Means AR (1983). Cyclic adenosine 3',  
5'-monophosphate, calcium and protein phospho-  
rylation in flagellar motility. Biol Reprod 28:  
75-104

48. Fraser LR (1981). Dibutyryl cyclic AMP decreases capacitation time in vitro in mouse spermatozoa. J Reprod Fertil 62: 63-72
49. Hyne RV, Garbers DL (1979). Calcium-dependent increase in adenosine 3'5'-monophosphate and induction of acrosome reaction in guinea pig spermatozoa. Proc Natl Acad Sci USA 76: 5699-5703
50. Mrsny RJ, Meizel S (1980). Evidence suggesting a role for cyclic nucleotides in acrosome reactions of sperm in vitro. J Exp Zool 211: 153-157
51. Rogers J, García L (1979). Effect of cAMP on acrosome reaction and fertilization. Biol Reprod 21: 365-372
52. Goldberg ND, Haddox MK (1977). Cyclic GMP metabolism involvement in biological regulation. Ann Rev Biochem 46: 823-896

53. Kimura H, Murad F (1975). Two forms of guanylate cyclase in mammalian tissues and possible mechanisms for their regulation. *Met Clin Exp* 24: 439-441
54. Chrisman TD, Garbers DL, Parks MA, Hardman JG (1975). Characterization of particulate and soluble guanylate cyclase from rat lung. *J Biol Chem* 250: 374-381
55. Garbers DL, Lust WD, Firts NL, Lardy HA (1971). Effect of phosphodiesterase inhibitors and cyclic nucleotides on sperm respiration and motility. *Biochemistry* 10: 1825-1831
56. Gray PJ, Drummond GI (1976). Guanylate cyclase at sea urchin sperm: Subcellular localization. *Arch Biochem Biophys* 172: 31-38
57. Garbers DL (1976). Sea urchin sperm guanylate cyclase. *J Bio Chem* 252: 4071-4077

58. Herman CA, Zahler WL, Doak GA, Campbell BJ (1976). Bull sperm adenylate cyclase: Localization and partial characterization. Arch Biochem Biophys 177: 622-629
59. Ross EM, Gilman AG (1980). Biochemical properties of hormone-sensitive adenylate cyclase. Ann Rev Biochem 49: 533-664
60. Schramm M, Selinger A (1984). Message transmission: Receptor controlled adenylate cyclase system. Science 225: 1350-1356
61. Gilman AG (1984). G proteins and dual control of adenylate cyclase. Cell 36: 577-579
62. Northup JK, Sternweis PC, Smigel MD, Scheleiffer LS, Ross EM, Gilman AG (1980). Purification of the regulation of the regulatory component of adenylate cyclase. Proc Natl Acad Sci USA 77: 6516-6520

63. Terman BI, Bitonti AJ, Moss J, Vaughan M (1985)  
Activation and stabilization of catalytic unit  
of adenylate cyclase. *Biochem J* 227: 91-97
64. Codina J, Hildebrandt JD, Sekura RD, Birnbaumer  
M, Bryan J, Manclark CR, Iyengar R, Birnbaumer  
L (1984).  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Ni}^{2+}$ , the stimulatory and inhi-  
bitory regulatory components of adenylate cyclase.  
Purification of the human erythrocyte  
proteins without the use of activating regulatory  
ligands. *J Biol Chem* 259: 5871-5874
65. Stengel D, Guenet M, Desmier P, Insel P,  
Hanoune J (1982). Forskolin requires more than  
the catalytic unit to activate adenylate cyclase.  
*Mol Cell Endocrinol* 23: 681-690
66. Braun TH, Frank R, Spenwol A (1977).  $\text{Mn}^{2+}$ -sen-  
sitive soluble adenylate cyclase in rat testis.  
Differentiation from other testicular nucleo-  
tides cyclases. *Biochim Biophys Acta* 481:  
227-235

67. Gordeladze JO, Hansson V (1980).  $Mn^{2+}$ - dependent adenylate cyclase (AC) in rat testis: Kinetic properties and optimization of assay conditions. *Int J Androl* 3: 539-552
68. Hildebrandt JD, Codina J, Tash JS, Kirchick HJ, Lipschultz L, Sekura RD, Birnbaumer L (1985). The membrane-bound spermatozoal adenylate cyclase system does not share coupling characteristics with somatic cell adenylate cyclase. *Endocrinol* 116: 1357-1366
69. Berger T, Clegg ED (1983). Adenylate cyclase activity in porcine sperm in response to female reproductive tract secretions. *Gamete Res* 7: 169-177
70. Reyes A, Chavarria ME (1985). Interference with acrosome reaction of spermatozoa by tubulin and actin-like protein inhibitors in guinea pig. *Adv Contracep Deliv Syst Monograph* II: 256-264

71. Barros C (1974). Capacitation of mammalian spermatozoa. Physiology and Genetics of Reproduction, Part B. Coutinho EM, Fuchs F (eds). Plenum Publishers, New York p 3-24
  
72. Wagner RC, Bitensky MW (1974). Adenylate cyclase. En: Electron Microscopy of Enzymes: Principles and Methods, Hayat MA (ed), Van Nostrand Reinhold Company. New York p. 110-131
  
73. Zahler WL, Gordon AD (1975). Isolation of the outer acrosomal membrane from bull sperm. Biochim Biophys Acta 406: 479-488
  
74. Primakoff O, Myles DG, Bellve AR (1980). Biochemical analysis of released products of mammalian acrosome reaction. Dev Biol 80: 324-376
  
75. Hemminki K, Suiraniemi O (1973). Preparation of plasma membranes from isolated cells of newborn rat brain. Biochim Biophys Acta 298: 75-83



76. Ashraff M, Peterson RN, Rusell LD (1982). Activity and location of cation dependent ATPases on plasma membrane of boar spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun* 107: 1273-1278
77. Lowry OH, Rosebrough AL, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275
78. Giles K, Myers A (1965). An improved diphenylamine method for estimation of desoxyribonucleic acid. *Nature* 206: 93
79. Hyne RV, Garbers DL (1979). Regulation of guinea pig sperm adenylate cyclase by calcium. *Biol Reprod* 21: 1135-1142
80. Schultz G (1974). General principles of assay for adenylate cyclase and guanylate cyclase activity. *Meth Enzymol* 38:115-125

81. Steiner AL (1974). Assay of cyclic nucleotides by radioimmunoassay methods. Meth Enzymol 38: 96-115
82. Tamayo J, Bellorin-Font E, Sicard G, Anderson CH, Martin KJ (1982). Desensitization to parathyroid hormone in the isolated perfused canine kidney. Reversal of altered receptor adenylate cyclase system by guanosine triphosphate in vitro. Endocrinology 111: 1311-1317
83. Snedecor G, Cochran J (1967). Statistical Methods. 6a, Ames, Iowa (ed). Iowa State Press.
84. Rogers BJ, Yanagimachi R (1975). Release of hyaluronidase from guinea pig spermatozoa through an acrosome reaction initiated by calcium. J Reprod Fert 44: 135-138
85. Reyes A, Goicochea B, Rosado A (1977). In vitro capacitation of mammalian spermatozoa by calcium ionophore A23187. Fertil Steril 28: 356

86. Rogers BJ (1978). Mammalian capacitation and fertilization in vitro: A critique of methodology. Gamete Res 1: 165-223
87. Meizel S (1978). The mammalian sperm acrosoma reaction a biochemical approach. En: Development in Mammalian. Vol 3, Johnson MH (ed). Elsevier, North-Holland, Biomedical Press. Amsterdam p. 1-64
88. Rosado A, Huacuja L, Delgado NM, Hicks JJ, Pancardo RM (1975). Cyclic-AMP receptor in the human spermatozoa membrane. Life Sci 17: 1707-1714
89. Santos-Sacchi J, Gordon M (1980). Induction of the acrosome reaction in guinea pig spermatozoa by cGMP analogues. J Cell Biol 85: 798-803
90. Weissman G, Goldstein I, Hoffstein S, Chauvet G, Robineaux R (1975). Ying/yang modulation of lysosomal enzyme release from polymorpho-

- nuclear leukocytes by cyclic nucleotides.  
Ann NY Acad Sci 256: 225-232
91. Peterson RN, Russell L, Hook L, Bundman D, Freund M (1980). Characterization and localization of adenylate cyclase in membrane vesicles and intact and human spermatozoa. J Cell Sci 43: 93-102
92. Atkins T, Matty AJ (1971). Adenyl cyclase and phosphodiesterase activity in isolated islets of Langerhans of abece mice and their lean litters. J Endocrinol 51: 67-71
93. Casillas ER, Hoskins DD (1971). Adenyl cyclase and cyclic 3',5'-AMP content of ejaculated monkey spermatozoa. Arch Biochem Biophys 147: 148-155
94. Stengel D, Guenet L, Hanoune J (1982). Proteolytic solubilization of adenylate cyclase from membranes deficient regulatory component. J Biol Chem 257: 10818-10826

95. Rosado A, Huacuja L, Delgado NM, Merchant H, Pancardo RM (1977). Elemental composition of subcellular structures of human spermatozoa. A study by energy dispersive analysis of X-ray. *Life Sci* 20: 647-656
96. Chasin M, Harris DN, Phillips MB, Hess SM (1972). 1-ethyl-4-(isopropylidenehydrazino)-1H-pyrazolo-(3, 4-6)-pyridine-5-carboxylic acid, ethyl ester, hydrochloride(SQ 20009) A potente new inhibitor of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterases. *Biochem Pharmacol* 21: 2443-2450
97. Maguire ME, Gilman AG (1974). Adenylate cyclic assay with adenylyl imidodiphosphate and product detection by competitive protein binding. *Biochim Biophys Acta* 38: 154-163
98. Town KM, Luke RK (1976). Measurement of adenylate cyclase activity in ram spermatozoa. *J Reprod Fert* 47: 355-357

99. Cheung WY (1980). Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. *Science* 207: 19-27
100. Means AR, Tash JS, Chafouleas JM (1982). Physiological implication of presence, distribution and regulation of calmodulin in eukaryotic cells. *Physiol Rev* 62: 1-39