

**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**

**DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA
SALUD**

TITULO:

**CINETICA DE LA DESCONDENSACION NUCLEAR DEL
ESPERMATOZOIDE HUMANO**

COORDINACION DE SERVICIOS
DOCUMENTALES - BIBLIOTECA

TESIS QUE PRESENTA

MARIA TERESA FONSECA FAVELA

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN BIOLOGIA DE LA
REPRODUCCION ANIMAL.

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Adolfo Rosado García

ENERO 1995

Teresa Fonseca : Cinética de la descondensación nuclear del espermatozoide humano

Este trabajo fué apoyado parcialmente por el Convenio C90-01-0282 de la
Secretaría de Educación Pública

INTRODUCCION

La célula espermática es el producto final del proceso de la gametogénesis en el macho (espermatogénesis), el cual se realiza en los túbulos seminíferos del testículo (Kretser y Kerr, 1994). A diferencia de lo que ocurre en el sexo femenino, el proceso de la espermatogénesis es continuo durante la edad adulta del macho y comprende la división mitótica y meiótica de las células germinales basales. Aún cuando los espermatozoides de todos los mamíferos presentan características generales, se observan variaciones entre las diferentes especies con respecto al tamaño y forma de la cabeza así como en la longitud y tamaño relativo de los componentes del flagelo. Para nosotros es de importancia referirnos particularmente al espermatozoide humano.

EL ESPERMATOZOIDE.

El espermatozoide humano es una célula muy alargada, de aproximadamente 60 μm de longitud por unas 3 μm en su parte más ancha. Constituye una célula extraordinariamente especializada cuyo propósito fundamental es doble:

- a).-iniciar la activación del ovocito y
- b).-transferir el material genético paterno.

Para poder llevar a cabo estas funciones, el espermatozoide humano, al igual que los de la mayoría de los animales, han desarrollado ciertas características propias que pueden ser resumidas de la siguiente manera:

- 1) Movilidad independiente, que junto con otros mecanismos, conduce al espermatozoide por el tracto genital femenino hasta encontrar el ovocito.
- 2) Capacidad para reconocer el ovocito especie específico a través de un receptor de zona pelúcida.

- 3) Habilidad para penetrar las capas externas del ovocito, interactuar con la membrana plasmática del mismo y finalmente provocar una fusión membranal entre ambos gametos (Krester y Kerr, 1994).

El espermatozoide de los mamíferos posee dos componentes principales, la cabeza y la cola o flagelo, estas dos partes, claramente diferenciables estructuralmente, se unen en la región llamada cuello.

La cabeza del espermatozoide humano mide aproximadamente 5-6 μm de longitud y unas 2.5 a 3.5 μm de ancho y contiene esencialmente la densa cromatina nuclear (compuesta por un número haploide de cromosomas) y el aparato acrosomal. En la cabeza se encuentra además una pequeña cantidad de citoplasma en el cual se han identificado algunas estructuras importantes relacionadas con el citoesqueleto.

El flagelo es una estructura en que la maquinaria de producción de energía, a partir de los sustratos consumidos, se encuentra ligada al mecanismo de generación de la movilidad indispensable para que la gameta se traslade al sitio donde se realizará su encuentro con la gameta femenina; finalmente. Tanto la cabeza como la cola, están envueltas por la membrana plasmática de una manera tan cercana, que solo permite la presencia de una pequeña cantidad de citoplasma.

La especialización funcional del espermatozoide puede encontrarse en cada uno de sus componentes, pero es francamente determinante en lo referente a la estructura de la cabeza, particularmente por la aparición de uno de los organelos indispensables para la realización de la fertilización, el acrosoma. También es notable la especialización de la estructura de la cromatina nuclear.:

EL ACROSOMA

El acrosoma constituye una transformación estructural del complejo de Golgi y del aparato lisosomal de las células somáticas. Este organelo característico del espermatozoide,

contiene enzimas que son esenciales para la fertilización. Aunque el acrosoma ha sido comparado con un lisosoma modificado, también ha sido descrito como un gránulo de secreción de ruptura regulada. En el acrosoma se ha descrito la presencia de numerosas enzimas, la mayor parte de ellas de carácter hidrolítico, entre las cuales es importante para nosotros mencionar las siguientes:

Error! Reference source not found. Acrosina	Fosfolipasa A2
Aril-amidasa	Fosfolipasas C
Aril-sulfatasa	Hialuronidasa
Aspartilamidasa	Neuraminidasa (sialidasa)
b-galactosidasa	Peptidasa, tipo Catepsina-D
Calpaina II	b-N-Acetil-glucosaminidasa
Esterasa	Dipeptidil-peptidasa
Fosfatasa ácida	Peptidasa de tipo Colagenasa.

EL NUCLEO

El núcleo ha sufrido una extensa modificación tanto química (sustitución de las histonas nucleares por protaminas específicas), como estructural (su volumen es significativamente menor que el requerido por el núcleo de una célula somática), de manera de conferirle las mayores posibilidades de realizar la transferencia del material genético dentro de las más estrictas condiciones de estabilidad. Las principales proteínas asociadas con el DNA en el núcleo del espermatozoide son las llamadas protaminas. Estas son polipéptidos relativamente pequeños y caracterizados por su riqueza en amino ácidos básicos, como la arginina y la cisteína. El RNA mensajero que codifica para la síntesis de las protaminas se sintetiza en las espermatidas, indicando que estas proteínas básicas son productos del genoma haploide que ya se encuentra en estas células de la estirpe germinal. El complejo Protamina-DNA, de gran compactación, debe esta propiedad, al menos en parte, a la formación de enlaces disulfuro entre las cisteínas que constituyen un gran porcentaje de la estructura de las protaminas. Es de suma importancia considerar que

algunos tipos de infertilidad masculina se han relacionado con la deficiente estructuración del núcleo espermático. Este aspecto de la estructura del espermatozoide será objeto de un estudio más cuidadoso en un apartado de esta tesis.

Desde un punto de vista más estricto, y orientado por la presencia de claros dominios regionales en la membrana plasmática que la recubre, y que mencionaremos con detenimiento un poco más adelante, la cabeza ha sido dividida en varias regiones:

La región apical o acrosomal que ocupa toda la mitad anterior del espermatozoide y que contiene la mayor parte del acrosoma. Es esta región en donde la estructura membranosa del espermatozoide es más complicada, estando formada sucesivamente por la membrana plasmática, las membranas acrosomales externa e interna, envolviendo el acrosoma, y la membrana nuclear. Es también en esta región en donde se verifica la fusión de las membranas plasmática y acrosomal externa que constituye parte de la llamada reacción acrosomal.

Es conveniente mencionar que recientemente se han identificado en el espermatozoide humano algunas estructuras del citoesqueleto colocadas en el estrecho espacio que separa el acrosoma de la superficie nuclear (región sub-acrosomal) y que representan el organelo llamado perforatorium estructuralmente presente en otras especies animales (Longo FJ, Cook S. 1991; Oko Y Clermont, 1991). La microscopía electrónica ha revelado que el acrosoma, particularmente el llamado segmento marginal, posee una sub-estructura compleja, que no es posible observar mediante la simple observación con el microscopio óptico, mostrando en algunas especies un aspecto lamelar o cristalino.

La región media o ecuatorial que contiene el extremo basal del acrosoma. Es en este punto donde la membrana acrosomal interna se continúa con la membrana acrosomal externa y donde se inicia la región en que la membrana plasmática cubre directamente la membrana nuclear. Es en esta región en donde, una vez que el espermatozoide ha sufrido la reacción acrosomal y penetrado a través de la zona

pelúcida, se inicia el contacto y se realiza la fusión con la membrana plasmática del ovocito.

Finalmente la región posterior, postacrosomal o basal que termina en el cuello y sirve de punto de unión con la parte más anterior del flagelo. En la estructura de la célula espermática este punto de unión está constituido por el llamado anillo posterior. Las partes principales de esta región del espermatozoide, que también ha sido llamada pieza conectora, son: el *capitulum* que pertenece al inicio del flagelo y está constituido por una densa lamina fibrosa que adquiere la forma del extremo distal del núcleo, la *fosa de implantación*, o sea la densa estructura fibrosa sobre la que termina el núcleo. De hecho la fosa de implantación está formada por la unión de la membrana nuclear y la llamada placa basal o placa densa. y, en tercer lugar, las *columnas segmentadas*. El tratamiento con tripsina del espermatozoide parece ser capaz de hidrolizar la unión entre el capitulum y la lamina basal y por lo tanto decapitar al espermatozoide. Otros tratamientos utilizados con este fin, como las aminas primarias o el dodecil-sulfato de sodio, actúan fundamentalmente separando las dos capas de la membrana nuclear. La pieza conectora termina en su parte distal en el punto en que comienza la protuberancia formada por la espiral mitocondrial.

La característica y especializada forma del espermatozoide es un reflejo de sus actividades funcionales únicas. Como ya mencionamos, el acrosoma contiene enzimas esenciales para la fertilización mientras el flagelo aporta la maquinaria y energía necesarias para la movilidad. El papel de estos componentes es asegurar la entrega del material genético contenido en el gameto masculino, al interior del gameto femenino, en donde la singamia de ambos pronúcleos da origen al cigoto.

Por su interés para nosotros como parte del sistema de descondensación nuclear in vitro es necesario revisar con mayor detenimiento tanto la estructura nuclear, como la estructura membranal del espermatozoide. En efecto, la necesidad de utilizar un detergente en los sistemas de descondensación nuclear que utilizaremos en nuestro trabajo, se relaciona directamente con la disrupción del sistema membranoso que recubre el núcleo del espermatozoide.

MEMBRANA PLASMÁTICA

La membrana plasmática del espermatozoide se haya caracterizada por la presencia de dominios superficiales claramente definidos, que difieren en composición y función, a pesar de que se su continuidad no se encuentra interrumpida sino en el extremo final de la cola.

La naturaleza heterogénea de la superficie del espermatozoide se hizo aparente por medio de estudios de potencial de membrana, detección de glicoproteínas específicas por medio de lectinas, marcado con anticuerpos específicos y estudio de los patrones de criofractura.

La evidencia de que la organización y composición de la membrana plasmática varía entre las diferentes regiones de la superficie del espermatozoide, favoreció el concepto de que dicha membrana esta constituida por un mosaico de dominios restringidos que reflejan la especializada función de los componentes superficiales del mismo (12 Fawcett, 1975). Estudios subsecuentes han demostrado que los dominios son zonas con dinámica propia que sufren cambios en organización y composición durante la vida de la célula.

Los principales dominios de la membrana plasmática coinciden aproximadamente con las subdivisiones de la cabeza espermática : *region acrosomal* (cabeza anterior) y *región postacrosomal* (cabeza posterior). La membrana plasmática de la región acrosomal puede ser subdividida en:

Teresa Fonseca : Cinética de la descondensación nuclear del espermatozoide humano

- (a) *segmento marginal* (segmento apical, banda anterior, borde periférico), dominio sobre el margen anterior del acrosoma,
- (b) *segmento principal* (segmento acrosomal), dominio sobre la porción mayor del acrosoma, y
- (c) *segmento ecuatorial* (acrosoma posterior), dominio sobre la parte posterior del acrosoma (Toshimori y Col, 1987). Los dominios de los segmentos marginal y principal son frecuentemente referidos en conjunto como el *acrosoma anterior* y el *capuchon acrosomal*. Ambos dominios están separados por el creyente central en el espermatozoide de cuyo y posiblemente de otras especies.

El dominio de la *region postacrosomal* (cabeza posterior, segmento postacrosomal) incluye la membrana plasmática entre el margen posterior del acrosoma y el cuello. El margen entre las regiones acrosomal y postacrosomal puede ser delimitada por la *banda aserrada* (anillo subacrosomal), la cual ciñe la cabeza del espermatozoide a nivel del margen posterior del segmento ecuatorial (Friend, 1982).

La membrana plasmática del flagelo está separada en el dominio de la *pieza media* que cubre la vaina mitocondrial y el dominio de la *cola posterior* (pieza principal, cola distal). Ambos dominios están separados por el *annulus*, un anillo fibroso que es componente del citoesqueleto flagelar y parece adherirse a la superficie interior de dicha membrana

Las primeras observaciones que sugirieron la heterogeneidad de la membrana plasmática del espermatozoide provienen de estudios sobre la carga neta superficial. En efecto, se observó que cuando espermatozoides de carnero, conejo o toro son suspendidos en un campo electroforético, todos ellos orientan el flagelo hacia el ánodo. Esto sugiere que el espermatozoide tiene una carga neta negativa y que la mayor parte de ella se encuentra más asociada con la cola que con la cabeza (Bedford, 1963).

Estudios posteriores realizados con ayuda de la microscopía electrónica, realizados con espermatozoides de conejo y garrón, demostraron que la unión de hidróxido de fierro

coloidal, positivamente cargado, es mayor en el flagelo que en la cabeza (López y Col, 1987).

Hay evidencias adicionales, proporcionadas por la utilización de lectinas o aglutininas vegetales, que han sido usadas ampliamente para demostrar que la membrana plasmática del espermatozoide esta regionalizada y no es uniforme en sus propiedades. Las lectinas se unen a moléculas de sacáridos particulares con una alta especificidad (Sharon y Lis, 1974). A menudo son multivalentes, pueden unirse por más de una región a una célula dada y causar aglutinación al unir dos células adyacentes. Las lectinas pueden ser conjugadas con marcadores fluorescentes, enzimas, marcas radiactivas o señalamientos visibles en el microscopio electrónico. Los ensayos de aglutinación realizados en espermatozoides de múltiples especies, demostraron que existen diferencias regionales con respecto a la cantidad y localización de sacáridos específicos en la superficie espermática. El uso de lectinas conjugadas con marcas fluorescentes o marcadores ultraestructurales, ha confirmado la heterogeneidad y permanencia de la distribución de sacáridos en la superficie del espermatozoide. Los resultados obtenidos son un poco diferentes de los observados en los estudios de aglutinación.

Un método histoquímico utilizando peroxidasa fue capaz de mostrar que la unión de Con A es más intensa en la cabeza que la cola del espermatozoide de conejo (Gordon y Col, 1975). Otros estudios ultraestructurales utilizando ferritina conjugada con diferentes lectinas y con diferentes tipos de espermatozoides, demostraron la repetición del mismo patrón. Todos estos estudios confirmaron una vez más que el número de sitios de unión a las lectinas es mayor en la cabeza que en la cola. Sin embargo los dominios de superficie reconocidos por las lectinas, a menudo no están bien definidos y se han observado diferentes patrones de unión para la misma lectina en espermatozoides de la misma especie.

Por medio de criofractura y réplica superficial, se han corroborado diferencias regionales que corresponden a dominios de la superficie espermática. Hay variación en el número, tamaño y patrón de distribución de las partículas intramembranales y en la presencia de otras estructuras asociadas a la membrana, relacionadas con diferentes regiones de

la membrana plasmática. El tamaño y la distribución de las partículas varía entre las diferentes especies y cambian con la maduración epididimaria, la capacitación y la reacción acrosomal. Sin embargo se han asociado patrones característicos con los segmentos marginal y ecuatorial del acrosoma anterior, el margen posterior del segmento ecuatorial y la región postacrosomal de la cabeza espermática. Se han observado otras especializaciones en la membrana plasmática que cubre el anillo posterior y el annulus.

En la mayoría de las especies, la membrana que cubre el acrosoma anterior y el segmento ecuatorial, contiene partículas intramembranas distribuidas al azar. Sin embargo se presentan numerosos arreglos hexagonales de partículas en estas mismas regiones del espermatozoide, particularmente en el espermatozoide de cuyo (Friend, 1980). El arreglo de partículas semeja un patrón de parches en la cubierta superficial (Bearer y Friend, 1990), la cual puede ser vista en cortes y réplicas de superficie, además puede ser eliminada del espermatozoide tratandolo con tripsina o neuraminidasa. La banda aserrada del margen posterior del segmento ecuatorial está formada por hileras de partículas empaçadas apretadamente. La localización y topografía general de esta banda, puede verse como un rasgo distintivo en todos los espermatozoides y puede ser observado tanto con el microscopio óptico (Koehler, 1970), como en el microscopio electrónico de transmisión y de barrido (Eddy y Koehler, 1982), particularmente cuando se utiliza la metodología de réplicas de superficie (Phillips, 1977).

La membrana plasmática del área postacrosomal de la cabeza espermática, generalmente presenta una población más densa de partículas intramembranas (Friend y Fawcett, 1974) que el área acrosomal, además de que algunas veces se presentan en aglomerados. La parte basal del área postacrosomal contiene cordones prominentes o bandas de partículas (Friend y Fawcett, 1974) que a menudo se presentan como palizadas. Yacen junto al anillo posterior que a su vez presenta un cinturón de cordones de pequeñas partículas en la membrana plasmática a nivel de la unión entre la cabeza y la cola (Friend y Fawcett, 1974).

El anillo posterior esta formado por la membrana plasmática que se haya fuertemente unida al cinturón de material denso y fibroso que yace bajo la envoltura nuclear y parece formar un sello entre los compartimentos de la cabeza y la cola, lo que permite mantener diferentes condiciones ionicas y metabolicas en la cabeza y el flagelo. En algunas especies, la membrana plasmática de la pieza media del flagelo contiene cordones de partículas , que corren en un arreglo diagonal y que coincide con la pendiente de las mitocondrias subyacentes colocadas en forma helicoidal (Friend y Fawcet, 1974). Se ha sugerido que las bandas de partículas pueden ser homólogas al collar de partículas de la base del cilio.

Estudios de criofractura seguida de tratamientos con agentes intercalantes de la membrana proporcionaron evidencia adicional de que la membrana plasmática difiere entre los diferentes dominios. El espermatozoide de cobayo tratado con filipina desarrolla complejos filipina/esteroide entre las placas de las partículas intramembranales en los dominios de los segmentos principal y ecuatorial de la región acrosomal (Friend, 1984). La filipina es un polieno que forma complejos de beta-hidroxiesteroles dando como resultado dominios ricos en estos complejos. La membrana plasmática de la región postacrosomal tiene menos de la cuarta parte de complejos filipina-esterol que la región acrosomal y el patrón producido sugiere que los esteroides se encuentran presentes principalmente en la cara externa de la bicapa (Friend, 1984). La membrana plasmática de la región acrosomal de los espermatozoides de garrón y hamster dorado también tienen cantidades significativamente mayores de esteroides que la región postacrosomal (López y de Souza,1987). El área entre los segmentos principal y ecuatorial en el espermatozoide de cuyo, a menudo presenta regiones circulares extensas libres de esteroides y partículas intramembranales (Friend, 1980).

Anticuerpos preparados contra espermatozoides, células germinales, células somaticas, o moléculas aisladas han sido capaces de identificar distintos dominios de superficie en el espermatozoide vivo. Los anticuerpos pueden ser conjugados directamente con varias marcas o detectados indirectamente con segundos anticuerpos que portan marcas visibles por microscopía de luz o electronica. Los anticuerpos también pueden ser usados para aislar o identificar moléculas especificas y descubrir su función por medio de bioensayos. En algunos casos se ha encontrado que antígenos compartidos

con otros tipos celulares están restringidos a regiones específicas de la superficie espermática .

Ejemplificando con el espermatozoide de ratón (a) un antisuero al antígeno H-Y, reacciona con la membrana plasmática sobre el segmento ecuatorial (Koo y Col, 1973), (b) un antisuero a F9 de células con terocarcinoma se une a la región postacrosomal (Fellous y Col, 1974) y (c), un antisuero a galactosiltransferasa se une a la región del segmento principal de la región acrosomal (López y Col, 1985). Antisueros a espermatozoides o células espermatogénicas también pueden reaccionar con regiones específicas como el segmento principal de la región acrosomal (O'Rand, 1977), la región postacrosomal, o la cola posterior.

Otros antisueros a células germinales reaccionan con múltiples regiones de la superficie espermática tales como el segmento ecuatorial, la región postacrosomal la pieza media (Koehler, 1974), la cabeza (Tung y Col, 1979), el flagelo completo o la superficie total del espermatozoide. Se especula tentativamente que los anticuerpos que reaccionan con regiones específicas pueden reconocer uno o pocos antígenos, mientras que aquellos que reaccionan con toda la superficie reconocen múltiples antígenos. Sin embargo la unión a toda la superficie espermática ha sido observada con antisueros a un solo antígeno (O'Rand, 1977) o antígenos múltiples (Herr y Eddy, 1980).

Aún cuando los anticuerpos monoclonales son a menudo específicos a moléculas particulares, también pueden reconocer epitopes compartidos por muchas células (Villaroya y Scholler, 1986). Más aún, los anticuerpos monoclonales que marcan solo un dominio de la superficie espermática pueden inmunoprecipitar proteínas de más de un peso molecular (Primakoff y Myles, 1983). En algunos casos estas proteínas son subunidades de un complejo molecular que coprecipita bajo tales condiciones (Blobel y Col, 1990), pero en otros casos pueden ser moléculas no relacionadas que comparten un epítope común reconocido por el anticuerpo.

Los anticuerpos monoclonales han sido usados para estudiar esperma de ratón, rata, cuyo, humano, cerdo, hamster y conejo. Algunos de estos anticuerpos reconocen

múltiples dominios, incluyendo aquellos de la superficie espermática total (Gaunt, 1983), la cabeza completa (Primakoff y Myles, 1983), o el flagelo total (Feuchter y Col, 1981). Sin embargo, otros suelen unirse a dominios individuales del segmento principal, el segmento ecuatorial, el acrosoma anterior, la región postacrosomal, la pieza media y cola posterior del espermatozoide vivo. Además algunos anticuerpos monoclonales reconocen patrones variables de aparentes subdominios en el espermatozoide. Esto puede ocurrir como resultado de la dispersión de componentes de la superficie espermática durante el procesamiento o enmascarado parcial de estos mismos por moléculas extrínsecas o su reubicación como consecuencia de la fluidez membranal (Saxena y Col, 1986). Sin embargo, se han realizado una gran cantidad de estudios usando anticuerpos monoclonales para diferentes especies que han confirmado que la superficie espermática está constituida por dominios bien definidos y que las diferentes proteínas y glicoproteínas pueden ser, también confinadas a dominios individuales o compartidos por múltiples dominios.

COMPOSICION DE LA MEMBRANA PLASMATICA

La membrana plasmática no posee contenidos poco usuales de colesterol o glicolípidos, pero contiene, relativamente, grandes cantidades de plasmalógenos y otros fosfolípidos con unión-éter (Wolf y Cols, 1990) y de lípidos con cadenas alifáticas poli-insaturadas (Evans y Col, 1980). Los fosfolípidos constituyen el 70% del total de los lípidos membranales en el espermatozoide de cerdo (Nikolopoulou y Col, 1985), y los fosfolípidos con colina constituyen casi dos terceras partes de los fosfolípidos en la membrana de la cabeza anterior del espermatozoide de camero (Parks y Hammersted, 1986). Los esteroides y sus derivados son los lípidos que siguen en abundancia, con una relación molecular colesterol fosfolípido aproximadamente de 0.12.

Los estudios de criofractura, han sugerido que la cantidad de esterol en la región anterior del acrosoma de los espermatozoides de cerdo y toro, es cuatro veces mayor que la que existe, en la región post acrosomal. En el espermatozoide de cuyo la región postacrosomal contiene algunos esteroides o lípidos aniónicos, aunque se ha encontrado que la gota citoplásmica de la pieza media es rica en ambos componentes. También el colesterol sulfatado constituye una pequeña fracción del contenido total de esteroides, pero es un componente mayoritario en la membrana plasmática sobre el acrosoma del espermatozoide humano (Langlais y Col, 1981).

Aunque en poca abundancia, existen glicolípidos característicos del espermatozoide (Parks y Col, 1987) que quizá controlan la organización lateral de los dominios membranales. (Wolf y Col, 1988). El glicolípidos más abundante en las células espermatogénicas y el espermatozoide es el sulfo-galactosil-glicerol (SGG), que también se encuentra, aunque en mucho menor cantidad en el cerebro. El SGG se encuentra presente tanto en la cabeza como en la cola del espermatozoide. Un anticuerpo monoclonal contra SGG es capaz de reaccionar con el segmento ecuatorial y la pieza media del espermatozoide de ratón.

Los ácidos grasos libres constituyen una pequeña cantidad de la composición lipídica en general, mientras que el diacilglicerol está presente en la misma cantidad que los glicolípidos (Nikolopoulou, 1985). La relación fosfolípido/proteína es de 0.68 aproximadamente, tomando como base el peso de la membrana total, lo que sugiere que la cantidad de lípidos totales y proteínas es casi la misma. Sin embargo esto es para la membrana plasmática en su totalidad, pero es posible que la cantidad, tipo de lípidos y la relación lípido/proteína sean distintas en los diferentes dominios. Más aún, hay cambios en el contenido lipídico que ocurren durante la maduración y la capacitación, lo que puede producir efectos substanciales en la composición y función de la membrana del espermatozoide.

CAPACITACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE.

Una vez terminada su maduración en el epidídimo, el espermatozoide es capaz de moverse activamente, pero aún no posee la capacidad inmediata de fertilizar. Esta capacidad se adquiere después de residir en el tracto femenino por cierto período de tiempo, que depende de la especie de que se trate. Los cambios morfo-fisiológicos que conducen a su habilitación para la fertilización son denominados colectivamente **capacitación**.

El descubrimiento de la capacitación fue el resultado de intentos frustrados de algunos pioneros que trataron de fertilizar ovocitos in vitro con espermatozoides eyaculados o

epididimarios. En 1949 Noyes, Finkle y Rocke encontraron que los espermatozoides de conejo recién eyaculados o colectados del vas deferens, eran incapaces de fertilizar ovocitos en el oviducto, mientras que los que habían estado residiendo en el oviducto de donadoras durante 4 a 8 horas, eran capaces de hacerlo (Noyes, 1953). Quizá estos investigadores no se dieron cuenta de la implicación de sus importantes hallazgos y nunca publicaron un trabajo completo en ese aspecto. Más aún, el crédito del descubrimiento de la capacitación fue atribuido a Chang (1951) y a Austin (1951) quienes documentaron por primera vez la evidencia experimental de la necesidad de la capacitación en el conejo y la rata. Fueron Thibault y sus colaboradores (Thibault, 1954) los que realizaron el primer reporte convincente del éxito de la fertilización in vitro en el conejo, usando espermatozoides que habían sido capacitados mediante su estancia durante varias horas en el útero de una coneja.

Aún ahora, a más de cuarenta años desde el descubrimiento de la capacitación, sus bases moleculares no son completamente entendidas. Sin embargo, se considera como un evento muy importante en la capacitación, la remoción o alteración de la capa protectora de la membrana plasmática del espermatozoide, lo cual sensibiliza dicha membrana al ambiente específico de la fertilización y sobre todo, permite que el espermatozoide localice y sea capaz de fijarse a la superficie del ovocito (Orgebin-Crist y Col, 1982).

En la actualidad es posible capacitar in vitro al espermatozoide de una amplia variedad de especies de mamíferos (Dunbar y O'Rand, 1991), pero debemos mantener en mente que la capacitación natural se lleva cabo dentro del tracto femenino, cuya fisiología está bajo el control endócrino, además del sistema nervioso autónomo.

Ejemplificando: durante el periodo periovulatorio, el moco cervical sirve para:

- (i) proteger al espermatozoide del medio ambiente vaginal hostil y de la fagocitosis por los leucocitos vaginales,
- (ii) previene la entrada del plasma seminal en el útero,
- (iii) excluye los espermatozoides morfológicamente y quizá funcionalmente, anormales
- (iv) retiene y conserva espermatozoides para su posterior migración hacia la parte superior del tracto genital para el caso de que la presencia de los primeros

espermatozoides no coincida con el momento adecuado para realizar la fertilización (Overstreet, 1983).

CAPACITACIÓN IN VIVO.

El sitio en donde los espermatozoides comienzan y terminan la capacitación puede variar de acuerdo a las especies. En las especies en las cuales el semen es depositado en el útero durante el coito, los espermatozoides parecen alcanzar la mayor parte de las etapas de la capacitación en el segmento inferior del istmo tubario, en donde son almacenados los espermatozoides que ya han adquirido la capacidad fertilizante.

En el hámster la capacitación espermática dentro del istmo progresa más rápidamente cuando las hembras se aparean después de la ovulación, que cuando lo hacen antes de la misma (Smith y Yanagimachi, 1978). Es poco probable que todos los espermatozoides completen su capacitación y dejen el istmo simultáneamente. En lugar de esto, parece que los espermatozoides son capacitados en una forma individual a diferentes velocidades (quizá debido en parte a diferencias fisiológicas entre ellos y su misma localización dentro del istmo) y abandonan esta región, pocos a la vez, durante un largo periodo. En el cerdo, este periodo puede ser de dos días o más. Quizá muchos espermatozoides mueren en este mismo lugar sin haber completado su capacitación.

En las especies en las cuales los espermatozoides son depositados en la vagina durante el coito, la capacitación puede comenzar mientras el espermatozoide pasa a través del moco cervical. El frote de los materiales adsorbidos en la superficie espermática (incluyendo proteínas del líquido seminal) contra la malla mucosa puede facilitar la capacitación (Katz y Col, 1989). Aunque algunos espermatozoides se encuentran ciertamente en una etapa avanzada de la capacitación después de su paso por el mucus, se desconoce hasta que punto realizan este proceso en el moco cervical y si los espermatozoides plenamente capacitados en este lugar son capaces de alcanzar el oviducto para participar en la fertilización. En el hámster, los

espermatozoides plenamente capacitados no poseen la capacidad de migrar del útero al oviducto de una manera eficiente, aún cuando el útero del hámster corresponde funcionalmente a la vagina de la coneja con respecto a la distancia en el tracto femenino entre el lugar donde se depositan los espermatozoides y el sitio donde se realiza la fertilización.

ESPECÍFICIDAD Y ESPECIALIDAD DEL TRACTO FEMENINO EN SU RELACIÓN CON LA CAPACITACION.

De acuerdo con Bedford (1977), los espermatozoides de conejo se capacitan más eficientemente cuando pasan de una manera secuencial a través del útero y del oviducto. Sin embargo, pueden ser plenamente capacitados en el útero sin necesidad de pasar por el oviducto (Brackett Y Server, 1970). La capacitación puede ocurrir lentamente en oviductos aislados y aún en cierto grado dentro de la vagina de la coneja (Bedford, 1967).

Los embarazos exitosos en la mujer después de la transferencia de gametos intra tubaria (GIFT) (transferencia de espermatozoides y ovocitos dentro del ámpula del oviducto), indican que los espermatozoides humanos no necesitan ser expuestos al ambiente del útero y de la región ístmica del oviducto para ser capacitados (Leeton y Col, 1987). La inseminación intraperitoneal directa, también ha dado casos de fertilización exitosa y embarazo, lo que comprueba que es posible la capacitación espermática dentro de la cavidad peritoneal y en el ámpula. Todos estos hechos sugieren que la capacitación in vivo no es estrictamente específica de órgano o tejido. La capacitación en el tracto femenino tampoco es especie específica, puesto que los espermatozoides y ovocitos de una especie pueden ser fertilizados en el tracto femenino de otra especie (Saling y Bedford, 1981).

Sin embargo, debe tenerse muy presente que la función más importante del tracto genital femenino parece residir en su habilidad para permitir, dentro del tiempo que permite la viabilidad restringida de las gametas, no solo la llegada de espermatozoides capacitados al lugar preciso en donde se realizará la fertilización, sino en un número

adecuado para realizar eficientemente la fertilización de todos los ovocitos ovulados. En los mamíferos en los que el apareamiento se realiza inducido por la presencia del estro en las hembras, los mecanismos que realizan el proceso de capacitación *in vivo* deben ser regulados con suficiente precisión para que la presencia de espermatozoides capacitados en el lugar de la fertilización quede asegurada casi independientemente del tiempo en que se realiza el coito en relación con el tiempo en que se realiza la ovulación. Todo esto, desde luego dependiendo de la viabilidad de las gametas.

La naturaleza bioquímica de los factores propios de las secreciones del aparato genital femenino responsables de controlar la capacitación se ha estudiado tanto en roedores de laboratorio como en animales domésticos, pero ésta no ha podido definirse aún con exactitud. Varias moléculas propias de estas secreciones han sido sugeridas como posibles factores capacitantes o reguladores de la capacitación, por lo menos cuando se utiliza la incubación *in vitro*: enzimas (β -amilasa, β -glucuronidasa, acetil hexosaminidasa, proteinasas, neuraminidasa, aril sulfatasa, fucosidasa, anhidrasa carbónica, esteroide sulfatasa, etc.); glicosaminoglicanos; catecolaminas; hormonas esteroides (17- β -estradiol, progesterona); proteínas (albúmina, lipoproteínas); nucleótidos cíclicos (AMPc, GMPc), aminoácidos (taurina, hipotaurina, histidina), iones mono y divalentes, substratos energéticos, etc. (Rosado, 1988; Yanagimachi, 1994; Rogers, 1978; Reyes y Col, 1980; Reyes y Col, 1990). Esta amplia variedad de compuestos no deja lugar a dudas de que se requiere más experimentación para determinar si alguno(s) de ellos realmente está(n) involucrado(s) en la capacitación *in vivo*; más aún, ninguno de estos compuesto, tomado independientemente, parece ser indispensable para la capacitación *in vitro*.

La incubación en presencia de prácticamente cualquier combinación de estas sustancias produce importantes modificaciones biofísicas y bioquímicas en la membrana plasmática de los espermatozoides. Los cambios más importantes que se sabe participan en la capacitación *in vivo* son:

- a) la eliminación o modificación de algunos componentes superficiales, adsorbidos o integrados a la membrana plasmática durante la maduración epididimaria y/o por contacto con el plasma seminal que actúan como factor(es) descapacitante(s) (Reyes y Col, 1990; Reyes y Col, 1975);

- b)** la disminución de la carga neta negativa superficial, aparentemente por la pérdida de ácido siálico y de algunos compuestos sulfatados (Rosado y Col, 1973; Cross y Overstreet, 1987);
- c)** cambios en la distribución de glicoconjugados superficiales (Cross y Overstreet, 1987);
- d)** modificaciones en la distribución y contenido de antígenos de superficie (Yanagimachi, 1994, Villarroya y Scholler, 1987);
- e)** cambios en el patrón de organización de las partículas intramembranales (Rosado, 1988; Reyes y Col, 1980);
- f)** modificaciones en la conformación de las proteínas propias de la membrana (Rosado, 1988);
- g)** cambios en la permeabilidad membranal a los iones, principalmente al calcio (Reyes y Col, 1980; Reyes, 1994).

Existen en la literatura numerosos y muy buenos trabajos de revisión en los que se analiza cuidadosamente el conocimiento actual sobre la regulación de la capacitación en diferentes especies animales (Rosado, 1988; Yanagimachi, 1994; Rogers, 1978; Bedford, 1983; Chang, 1984; Yanagimachi, 1990), por lo que en este trabajo la discusión versará principalmente acerca de los avances recientes en el estudio de la capacitación en humanos.

EVENTOS PRINCIPALES QUE OCURREN EN LOS ESPERMATOZOIDES HUMANOS DURANTE LA CAPACITACION.

Los mecanismos que regulan, así como la secuencia de eventos que se suceden durante la capacitación *in vivo* en estas células son prácticamente desconocidos, a pesar de la posibilidad actual de utilizar material biológico y técnicas que eran prácticamente inaccesibles hasta hace 10 años. Sin embargo, la amplia aplicación actual de las técnicas de fertilización *in vitro* y de reproducción asistida en general requiere de estudiar con mayor precisión y abundancia los mecanismos que regulan la capacitación *in vitro* y la inducción de la reacción acrosomal en el espermatozoide humano.

222470

MOVILIDAD.- La movilidad espermática es considerada como uno de los parámetros importantes en el proceso de la fertilización, ya que participa tanto en el transporte de los espermatozoides hacia la región ampular de la trompa de falopio, así como durante la interacción de los gametos y los eventos previos a la fusión de los mismos. El primer cambio en el patrón de movilidad que se observa *in vitro* después de la eyaculación, parece ser inducido por la eliminación del plasma seminal y/o por la resuspensión de los espermatozoides en alguna solución fisiológica o medio de cultivo. En este caso, la velocidad de desplazamiento celular aumenta y la movilidad se torna vigorosa y unidireccional (Robertson y Wolf, 1988) Este cambio se ha asociado principalmente a la menor viscosidad que tienen los medios de cultivo comparados con el plasma seminal (Robertson y Wolf, 1988) pero no es indicativo de capacitación.

En diferentes especies de mamíferos se han identificado cambios característicos en la movilidad espermática asociados con la etapa final de la capacitación y el disparo de la reacción acrosomal, tanto *in vitro* como *in vivo*; estos cambios se conocen genéricamente con el término de "hiperactivación" (Yanagimachi, 1994). La expresión más obvia de la hiperactivación es la movilidad más vigorosa pero con poco desplazamiento progresivo, debida 1) al aumento en el movimiento y flexión del flagelo, 2) a la gran amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza y 3) a que la trayectoria observada es curvada y tortuosa o bien con tipo de estrella (Robertson y Wolf, 1988, Morales y Col, 1988). La importancia funcional de la hiperactivación puede incluir la regulación del transporte espermático en el oviducto y la generación de la fuerza

requerida para la penetración de la capa de células de granulosa y de la zona pelúcida en el ovocito (Yanagimachi, 1994).

Varios investigadores han publicado sus observaciones acerca de los cambios en la trayectoria de los espermatozoides humanos durante la capacitación *in vitro*, habiéndose realizado estudios detallados del movimiento flagelar que demuestran la aparición de hiperactivación en aproximadamente 20% de los espermatozoides después de incubarlos en condiciones adecuadas (Robertson y Wolf, 1988, Morales y Col, 1988; Tesarik y Col, 1990). Por otra parte, se ha demostrado que estos cambios en el patrón de movilidad, además, se presentan preferentemente en espermatozoides con morfología normal y que en los espermatozoides provenientes de pacientes infértiles, la proporción que presenta los movimientos característicos de la hiperactivación es significativamente menor (Morales y Col, 1988). En los individuos oligozoospermicos estas alteraciones en la movilidad están asociadas también con una menor capacidad de los espermatozoides para completar la capacitación, lo cual puede explicar, al menos en parte, su incapacidad de fertilizar.

Recientemente se demostró en el hámster que la expresión de la hiperactivación en los espermatozoides capacitados *in vitro* es precedida por una elevación en las concentraciones intracelulares del monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) y del calcio, asociadas con una disminución en el pH intracelular (White y Aitken, 1989). En los espermatozoides humanos se han demostrado cambios similares a los descritos anteriormente en las concentraciones intracelulares de calcio y protones, cuando son incubados en condiciones de capacitación (Reyes y Col, 1990, Reyes, 1994), pero su relación con la hiperactivación no se ha establecido.

Componentes tanto del *cumulus oophorus* como del líquido folicular humano tienen un efecto estimulante en la movilidad de los espermatozoides capacitados (Reyes y Col, 1990, Reyes, 1994; Tesarik y Col, 1990; Mendoza y Tesarik, 1990); este hecho, así como la existencia de un tipo particular de desplazamiento que está asociado con la incubación de estas células en presencia de componentes solubles del cumulus (Tesarik y Col, 1990), apoyan la posibilidad de que la hiperactivación forme parte del fenómeno de capacitación en los humanos.

CAMBIOS METABOLICOS.- Tanto el desplazamiento de los espermatozoides hasta el sitio de la fertilización *in vivo*, como la penetración *in vivo* e *in vitro* de las diferentes capas que envuelven a los ovocitos, requieren de un gasto energético considerable, por lo que es necesario que las vías metabólicas espermáticas se encuentren activadas, incluyendo a todos los sistemas enzimáticos.

a) **Metabolismo.-** Algunos aspectos del metabolismo energético de los espermatozoides humanos se han investigado durante la capacitación *in vitro*, habiéndose demostrado la importancia de la presencia de sustratos glicolisables en los medios de incubación ya que los gametos masculinos obtienen la mayor parte de su energía a partir de esta vía.

Hicks y colaboradores estudiaron el efecto del AMPc, el 17- β -estradiol y el líquido folicular sobre la glicólisis en estas células y reportaron un incremento significativo en el consumo de oxígeno, cuando se adicionaron los componentes antes mencionados a los sistemas de incubación (Hicks y Col, 1972). Estos autores analizaron también, por medio de sustratos marcados radiactivamente, la preferencia espermática para utilizar una o más de las vías metabólicas de la glucosa y demostraron que durante la capacitación *in vitro* la glucosa se utiliza preferentemente por la vía glicolítica, aunque existe también un consumo alternativo al través de la vía de las pentosas (Hicks y Col, 1972).

Por otra parte, Rogers y Perreault demostraron que la estimulación de la glicólisis facilita la capacitación *in vitro* en los espermatozoides humanos y que la optimización de este proceso depende tanto del tipo de carbohidrato utilizado (glucosa> manosa> fructosa>> galactosa), como de su concentración (Rogers y Perreault, 1990).

Una explicación posible para el efecto estimulante del líquido folicular sobre el metabolismo espermático reside en la presencia de histidina como uno de los aminoácidos más abundantes en esta secreción (Velazquez y Col, 1977), ya que Delgado y col. (1975) reportaron que la incubación en presencia de este aminoácido favorece la liberación del zinc endógeno en los espermatozoides humanos lavados, lo

que induce un incremento significativo en su consumo de oxígeno y en la movilidad, así como otros cambios en el metabolismo de estas células.

b) Actividad Enzimática.- Tanto el inicio y mantenimiento de la movilidad, como la activación del metabolismo espermático están asociados con la activación de sus sistemas enzimáticos. Como ejemplos de las enzimas estudiadas durante la capacitación están la adenilil ciclasa, las protein cinasas, las ATPasas y la fosfolipasa A₂.

Existen evidencias de que la actividad de la adenilil ciclasa espermática se incrementa durante la capacitación, lo cual a su vez aumenta la concentración intracelular de AMPcíclico (Reyes y Col, 1988). Estos cambios no solo favorecen la movilidad vigorosa en los espermatozoides (Reyes y Col, 1988), sino que estimulan también la actividad de las protein cinasas dependientes de este nucleótido. Es posible que la fosforilación de proteínas inducida por el AMPc induzca cambios en las propiedades fisiológicas de las membranas espermáticas, principalmente a través de cambios en las estructuras terciaria y cuaternaria de las proteínas membranales (Rosado, 1988; Huacuja y Col, 1977; García y Col, 1991).

Por otra parte, la actividad de la fosfolipasa A₂ ha sido asociada con los eventos de fusión membranal característicos de la reacción acrosomal (Rosado, 1988; Huacuja y Col, 1977; García y Col, 1991). La acción de esta enzima sobre los fosfolípidos de la membrana espermática provoca la acumulación de lisofosfolípidos, compuestos capaces de producir fusión y lisis membranal (Meizel, 1985). Recientemente se reportó que la actividad de esta enzima aumenta significativamente cuando los espermatozoides humanos se incuban en presencia de AMPc y líquido folicular, así como la posibilidad de que los cambios en la distribución subcelular de esta enzima participen en la capacitación espermática (Rosado, 1988; Huacuja y Col, 1977; García y Col, 1991).

c) Transporte de Iones .- Los espermatozoides viables mantienen gradientes iónicos precisos al través de su membrana plasmática, los cuales se regulan principalmente mediante ATPasas dependientes de sodio, potasio o calcio. La relación iónica intra/extracelular no es constante y se modifica durante la incubación en condiciones de capacitación (Reyes y Col, 1988; Reyes, 1994). Estos movimientos iónicos tienen como

resultado la activación de enzimas como la adenilil ciclasa y enzimas de origen acrosomal, y han sido asociados también con los cambios en las características de la movilidad durante la capacitación (Reyes y Col, 1978, Meizel, 1978, Reyes y Col, 1988).

c.1) ATPasas Dependientes de Iones.- Gordon y col. (1978) reportaron la presencia de una ATPasa dependiente de calcio en la membrana acrosomal externa de los espermatozoides de cobayo, sugiriendo que esta enzima bombea calcio hacia adentro del acrosoma, estimulando la reacción acrosomal. Ashraff y col. (1982) encontraron esta enzima en la membrana plasmática de la cabeza o el flagelo espermáticos y García y col. (1991) demostraron la presencia de una ATPasa dependiente de Ca^{2+} no solamente en los espermatozoides de cobayo sin acrosoma, sino también en las membranas periacrosomal y acrosomal externa. La actividad asociada con la membrana plasmática representó cerca del 25% de la actividad enzimática total y fue, en condiciones basales, cerca del doble que la observada en la membrana acrosomal. Cuando se llevó a cabo la reacción acrosomal, pareció llevarse a cabo una redistribución de la enzima, junto con un incremento significativo en la actividad presente en los espermatozoides sin acrosoma, al comparar con los controles.

Ashraff y col. (1982) reportaron también que la actividad de la ATPasa dependiente de Na^+ y K^+ en los espermatozoides de cerdo está restringida al flagelo, y García y col. (1991) encontraron que, en el cobayo, una proporción importante (70-75%) de la actividad total de esta enzima puede recuperarse en el precipitado final (espermatozoides sin acrosoma). Sin embargo, la actividad específica de esta enzima fue significativamente mayor en la membrana plasmática (5 a 8 veces más), lo que apoya la idea de que la ATPasa dependiente de Na^+ y K^+ de la membrana plasmática de la cabeza de los espermatozoides tiene una actividad fisiológicamente importante y no es resultado de contaminación. Más aún, la incubación en medio capacitante aumentó la actividad de la enzima tanto en la membrana plasmática como en la acrosomal externa. Estos incrementos, junto con la presencia constante de esta actividad en la fracción de espermatozoides sin acrosoma, apoyan aún más la idea de que esta enzima tiene una participación importante en la capacitación.

CAMBIOS MEMBRANALES.-

a) Rearreglo Membranal.- Las membranas son un ensamble dinámico de proteínas y lípidos capaces de responder a las señales ambientales que modifican funciones celulares específicas. Los cambios en la topografía membranar, o la redistribución de las moléculas de la superficie celular dentro o fuera de regiones específicas, pueden considerarse como adaptaciones fisiológicas a las modificaciones ambientales. Actualmente se sabe que el arreglo de las moléculas en regiones discretas en la superficie celular, es de la mayor importancia para el desempeño normal de las células. La topología membranar de las moléculas superficiales puede controlar su función determinando el ambiente de la molécula, ya sea mediante las interacciones entre las moléculas entre sí o entre las moléculas que pertenecen a diferentes células adyacentes.

La redistribución o los cambios estructurales en la topología superficial de las moléculas membranales pueden ocurrir, teóricamente, a través de varios mecanismos incluyendo:

1) enmascaramiento o desenmascaramiento de moléculas superficiales, tanto por adsorción de moléculas del solvente o por rearreglo de proteínas membranales intrínsecas; estos procesos modifican la exposición al medio ambiente de proteínas específicas, haciéndolas accesibles o inaccesibles como sitios de fijación o reconocimiento;

2) inserción local de moléculas por adsorción del medio ambiente o, por el contrario, supresión de las mismas por disolución en el medio de suspensión de la célula;

3) migración de moléculas presentes en la superficie (Stryer, 1988). La migración lateral puede estimularse por la fijación de ligandos y es evidente en el fenómeno de "capping"; sin embargo, este tipo de migración se ha observado también en ausencia de interacción con ligandos, un ejemplo puede ser el agrupamiento de los receptores a acetil colina en miotúbulos en cultivo.

Las modificaciones en la topología membranar pueden propiciarse también por cambios en la composición de los lípidos, que a su vez pueden inducir el rearreglo en las

proteínas superficiales de acuerdo con las variaciones en la polaridad del medio ambiente (Stryer, 1988).

a.1) Antígenos.- Durante la capacitación los espermatozoides experimentan alteraciones en su expresión antigénica. Por ejemplo, Okabe y Col, (1987) desarrollaron un anticuerpo monoclonal que presenta un aumento en su reactividad con los espermatozoides capacitados, comparados con los espermatozoides sin capacitar. Utilizando anticuerpos monoclonales desarrollados en contra de espermatozoides humanos, Villarroya y Scholler (1987) demostraron cambios en la fijación del anticuerpo después de la capacitación. Ellos demostraron también una migración de los antígenos, dependiente de calcio, de la parte anterior de la cabeza a la región postacrosomal después de la reacción acrosomal.

Myles y Primakoff (1985) describieron que después de la incubación en condiciones de capacitación, los espermatozoides presentan migración de antígenos superficiales presentes originalmente en la parte posterior del flagelo, hacia la parte anterior del mismo. Estos autores sugirieron que esta redistribución obedece a un proceso que requiere energía, es dependiente de temperatura, ocurre en ausencia de calcio exógeno y se bloquea cuando se impide el movimiento espermático. Además, el antígeno conocido como PH-20, localizado exclusivamente en la región posterior de la cabeza en los espermatozoides con acrosoma intacto, migra después de la incubación en condiciones capacitantes hacia la región anterior de la cabeza y después de que se lleva a cabo la reacción acrosomal, puede demostrarse en la membrana acrosomal interna.

Puesto que en estos dos casos no fue posible demostrar la participación de un ligando externo, los autores sugirieron que estos rearrreglos membranales funcionan como respuesta a un programa interno que ocurre durante la capacitación. La migración de antígenos en dirección opuesta, de la cabeza al flagelo, se ha descrito en el cerdo (Bearer y Friend, 1990).

b) Factor(es) Descapacitante(s).- Existen evidencias de que durante y después de la eyaculación, algunos componentes del plasma seminal (glicoproteínas, polipéptidos,

proteínas) se fijan firmemente en la superficie de los espermatozoides inhibiendo su capacidad fertilizante. Esta unión, denominada "descapacitación", es tan firme que algunas de estas moléculas no pueden removerse de la membrana espermática mediante lavados repetidos con soluciones fisiológicas, y la eliminación o modificación de estos materiales adsorbidos se ha considerado como uno de los eventos esenciales de la capacitación *in vivo* ó *in vitro* (Yanagimachi, 1994; Reyes y Col, 1980; Reyes, 1994).

La presencia en el plasma seminal y en secreciones obtenidas de diferentes órganos del aparato reproductor masculino de componentes que previenen o revierten la capacitación, fue descrita desde hace 15-20 años; sin embargo, debido a que se han encontrado varias moléculas con estas características (Yanagimachi, 1994; Reyes y Col, 1980; Reyes y Col, 1990, Reyes, 1994), su naturaleza bioquímica no ha sido completamente elucidada. Se ha sugerido que el(los) factor(es) descapacitante(s) actúa(n) en la membrana espermática bloqueando receptores, grupos funcionales, enzimas, mecanismos o canales de intercambio iónico, etc. y que sus funciones incluyen la protección de la integridad de los espermatozoides durante su estancia en el ambiente vaginal, así como la inhibición de la reacción acrosomal en regiones del aparato genital femenino que no son las apropiadas (Yanagimachi, 1994; Reyes y Col, 1980; Morales y Col. 1988).

c) Componentes de la Membrana.- El análisis morfológico de los espermatozoides en proceso de capacitación sugiere que no suceden cambios previos a la reacción acrosomal; sin embargo, el uso de métodos de análisis más precisos ha indicado la existencia de cambios membranales importantes durante la capacitación, tanto a nivel superficial (bioquímicos) como intramembranal (ultraestructurales), además de la eliminación de los materiales adsorbidos durante la maduración epididimaria y la eyaculación. Entre estos cambios se han identificado los siguientes:

c.1) Proteínas.- De acuerdo al modelo aceptado de las membranas biológicas como "mosaicos fluidos", las proteínas y glicoproteínas están asociadas con las bicapas de lípidos que forman la matriz membranal mediante uniones no covalentes (Rosado, 1988; Reyes y Col, 1990, Reyes, 1994; Stryer, 1988). Estas proteínas intrínsecas que forman



parte de la bicapa, solo pueden eliminarse mediante tratamientos severos (uso de detergentes por ejemplo); sin embargo, existen proteínas localizadas en la superficie celular (periféricas) que se asocian con la membrana principalmente mediante interacciones electrostáticas y pueden eliminarse por medio de agentes quelantes, modificando el pH o la fuerza iónica del medio de cultivo. La capacitación espermática involucra principalmente cambios en las proteínas superficiales (Rosado, 1988; Reyes y Col, 1990, Reyes, 1994; Yanagimachi, 1994).

La distribución de estas proteínas y glicoproteínas en la membrana de los espermatozoides humanos ha sido estudiada mediante el análisis de los patrones de fijación de lectinas y anticuerpos monoclonales fluorescentes (Cross y Overstreet, 1987). La capacitación *in vitro* de estas células cambia el patrón de fijación de estas moléculas, a semejanza de lo que ocurre en otras especies de mamífero, lo que refleja pérdida de componentes superficiales o bien alteraciones en la carga superficial de las células. De hecho, mediante el uso de técnicas electroanalíticas (polarografía), se ha demostrado que la carga negativa y el contenido de ácido siálico en la superficie de los espermatozoides humanos efectivamente disminuye cuando se incuban en condiciones de capacitación (Rosado y Col, 1973).

Por otra parte, el análisis con microscopía electrónica de los espermatozoides incubados con líquido folicular indica un rearrreglo de la capa superficial de glicoproteínas (glicocálix), junto con la aparición de áreas libres de estas moléculas en la región acrosomal, así como un agrandamiento substancial en el tamaño y la cantidad de material filamentosos superficial (Reyes y Col, 1980). Este reacomodo parece deberse al intercambio de glicoproteínas entre las secreciones propias del aparato genital femenino y la membrana de los espermatozoides. En el humano no se conoce el efecto que tienen estas secreciones en relación a la capacitación, pero en los ovinos por ejemplo, se ha demostrado que la incubación de los espermatozoides en presencia de líquido uterino y/o líquido de oviducto recolectados durante la etapa de estro, tiene como consecuencia la liberación de proteínas de la superficie espermática, así como la adsorción de proteínas de estas secreciones en las membranas. Reyes y col. demostraron que este proceso forma parte de la capacitación en los espermatozoides de carnero (1975).

La espectroscopía de infrarrojo se ha utilizado para obtener información acerca de la conformación de las proteínas intrínsecas de las membranas. En el caso de los espermatozoides humanos, estudios realizados utilizando esta herramienta han demostrado que la conformación de una gran proporción de las proteínas de las membranas corresponde al tipo β que es el más estable, pero durante la capacitación estas proteínas membranales cambian hacia conformaciones menos estables (hélice α y/o enrollamiento al azar). Estos cambios estructurales parecen iniciarse por la fosforilación dependiente de AMPc de estas proteínas (Huacuja y Col, 1977) y podría deberse también, al menos en parte, a los cambios físicos y/o químicos simultáneos que suceden en los lípidos de la membrana durante la capacitación (Toshimori y Col, 1987).

Por otra parte, la fibronectina es una glicoproteína de alto peso molecular que se identifica principalmente en la superficie de la membrana plasmática de los espermatozoides incubados toda la noche en condiciones de capacitación *in vitro*. Esta proteína contiene la secuencia de aminoácidos ARG-GLY-ASP (RGD), que participa en muchos sistemas de adhesión célula-célula y célula-matriz, como una secuencia de reconocimiento de los receptores membranales celulares conocidos como integrinas (Mercado y Rosado, En prensa). Recientemente se demostró que varios oligopéptidos derivados de la fibronectina que contienen la secuencia RGD inhiben competitivamente la adhesión de los espermatozoides humanos a los óvulos de hámster y su penetración posterior, implicándose a los receptores de integrina en la interacción de los gametos.

c.2) Lípidos.- A partir de 1976 cuando Davis y col. demostraron en el conejo que los espermatozoides capacitados *in vivo* pierden su capacidad fertilizante al colocarse en un medio de incubación rico en colesterol, el estudio de la participación de los lípidos (endógenos y exógenos) en la capacitación ha ocupado numerosas páginas en libros y revistas especializados.

La composición de los fosfolípidos y su relación molar con el colesterol regulan la fluidez y la permeabilidad iónica en todas las membranas biológicas; estos dos parámetros membranales cambian durante la capacitación espermática (Rosado, 1988; Reyes y Col, 1990, Reyes, 1994). En el caso de los espermatozoides humanos existen evidencias de

que la capacitación *in vitro* involucra la eliminación de colesterol de la membrana plasmática, fenómeno reversible que está asociado con la presencia de proteínas aceptoras de esteroides en el medio de incubación (Yanagimachi, 1990, Yanagimachi, 1994, Reyes, 1994).

222470

Las concentraciones plasmáticas de colesterol y fosfolípidos se midieron en espermatozoides humanos completos, así como en fracciones aisladas de cabezas y flagelos, antes y después de la incubación en un medio capacitante químicamente definido (Reyes, 1994; Yanagimachi, 1994). Se observó que la capacitación influyó principalmente en el contenido de lípidos de la cabeza de los espermatozoides; tanto el colesterol como la relación colesterol/fosfolípidos disminuyeron 20 y 30% respectivamente en esta fracción después de la incubación. La adición de líquido folicular o suero sanguíneo femenino a este medio de incubación, produjo la eliminación de 40-50% del colesterol membranal, el cual se recupera unido a las lipoproteínas y la albúmina presentes en estas secreciones.

Las alteraciones físicas y/o químicas de la bicapa de lípidos membranales durante la capacitación, parecen tener como resultado adicional la inducción de modificaciones en las proteínas intrínsecas de la membrana plasmática, lo que se demuestra mediante la inducción de rearrreglos en las partículas intramembranales, analizables mediante criofractura. Se ha observado la aparición de zonas carentes de estas partículas en la membrana plasmática de los espermatozoides capacitados; estas áreas, a diferencia de las áreas circunvecinas ricas en partículas intramembranales, carecen prácticamente de colesterol y tienen un contenido muy escaso de lípidos aniónicos (por ejemplo cardiolipina). Estos cambios en la composición de las proteínas y los lípidos membranales pueden estar relacionados con los cambios descritos en las propiedades biofísicas y fisiológicas de la membrana plasmática de los espermatozoides, particularmente en relación con el transporte de iones y la posibilidad de llevar a cabo la fusión membranal.

d) Receptores y Grupos Funcionales.-

d.1) Receptores.- Todas las membranas biológicas poseen moléculas superficiales (proteínas) que actúan como receptores para diversos compuestos exógenos como enzimas, hormonas, proteínas, etc. En el caso de los espermatozoides humanos se han

identificado receptores membranales a moléculas como nucleótidos cíclicos (AMPc), esteroides (17- β -estradiol) y glicosaminoglicanos (heparina), cuya actividad se modifica durante la capacitación *in vitro*.

d.2) Grupos Funcionales.- Como ejemplo de los cambios superficiales inducidos durante la capacitación *in vitro*, Rosado y col. analizaron comparativamente el contenido membranal de grupos -SH (sulfhidrilo) y grupos -NH₂ (amino) presentes tanto en espermatozoides humanos lavados, como incubados en presencia de líquido folicular (Rosado y Col, 1973). Ellos encontraron que la presencia de este líquido biológico produce una disminución de casi 50% en el número de grupos amino libres y de 18% en el número de grupos -SH activos, después de 3h de incubación. Posteriormente, Reyes y col. demostraron la importancia de los grupos -SH membranales durante la capacitación-fertilización, al reportar que cuando estos grupos funcionales se bloquean químicamente se interfiere significativamente con la habilidad de los espermatozoides de conejo para capacitarse *in vivo* (Reyes y Col, 1980).

DESCONDENSACION DEL NUCLEO ESPERMATICO EN EL OOPLASMA.

NUCLEO ESPERMATICO

Antes de discutir el proceso y mecanismo de la descondensación nuclear del espermatozoide, es necesario describir algunos de los rasgos que caracterizan el núcleo del espermatozoide de los mamíferos.

Debemos mencionar en este punto que la membrana nuclear del espermatozoide posee también características sui generis, siendo diferente a la de las células somáticas en dos hechos fundamentales (Eddy y O'Brien, 1994)

- a) mientras que en la mayoría de las células somáticas la distancia entre las dos capas de la membrana nuclear es de 40 a 60 nm, en el espermatozoide esta distancia es de solo 7 a 10 nm, y
- b) ausencia de poros en la mayor parte de su extensión

HISTONAS Y PROTAMINAS EN EL NUCLEO.

Tanto en las células somáticas, como en la espermatogonia y en los espermátocitos, las histonas son sintetizadas en el núcleo durante la interfase del ciclo celular y luego unidas al DNA recién sintetizado. Durante la transformación de espermátidas redondas a espermatozoides, todas o casi todas sus histonas son substituidas por proteínas transicionales y después por protaminas más básicas que son ricas en arginina, serina y cisteína (Poccia, 1986). Esta substitución secuencial de proteínas coincide con la compactación de la cromatina y la represión de la actividad transcripcional en el núcleo (Hecht, 1989). En los espermatozoides de humano y de ratón, pequeñas cantidades de histonas permanecen unidas al DNA. También ha sido reportada la persistencia de las proteínas de transición en el núcleo del espermatozoide de humano. En el eyaculado humano existe una proporción variable de núcleos inmaduros (Bedford y Col, 1973) y quizá esto pueda contribuir a la presencia de tales proteínas. De hecho la proporción de histonas y proteínas de transición son considerablemente mayores en los espermatozoides de los hombres infértiles que en los fértiles (Blanchard y Col, 1990).

Un evento desusado dentro del núcleo espermático de los mamíferos euterios es la extensa conversión de grupos SH a grupos S-S en las protaminas durante el pasaje (maduración) a través del epidídimo (Seligman y Col, 1991). Esto transforma al núcleo en una estructura resistente al daño físico y químico. La rigidez del núcleo conferida por su cualidad protéica parece ser benefica para el pasaje mecánico de la cabeza espermática a través de la zona pelúcida.

EMPAQUETAMIENTO DEL DNA EN EL NUCLEO ESPERMATICO

El DNA es empacado de una manera única dentro del núcleo espermático. En el núcleo somático de las células, el DNA es empacado primariamente en nucleosomas, en los cuales aproximadamente 140 pares de bases del DNA dan casi dos vueltas a un octámero de histonas; los nucleosomas adyacentes seran agrupados a su vez en solenoides. De acuerdo a un modelo establecido (Ward y Col, 1989), las protaminas en el núcleo espermático se unen al DNA adhiriendose a lo largo de la curvatura menor,

con hilos de DNA, formando un paquete paralelo en un arreglo lineal. La cromatina queda así arreglada de una manera ordenada dentro de la matriz nuclear (Bellve, 1992).

Por medio de la microscopía de luz y por el microscopio electrónico, es posible observar el núcleo espermático que aparece como una estructura homogénea de cromatina altamente compactada. Los cromosomas individuales no pueden ser identificados. Sin embargo ahora es posible determinar la presencia o ausencia de cromosomas específicos (ej. los cromosomas X y Y) en el núcleo del espermatozoide por hibridación in situ usando pruebas moleculares específicas (Han y Col, 1993).

El tamaño y forma de la cabeza espermática esta determinada por el tamaño y forma del núcleo y en la parte rostral por el acrosoma. El mecanismo por el cual son determinadas las características especie específicas de estos organelos es aun desconocida (Pogany y Balhorn, 1992) sin embargo es conveniente mencionar el descubrimiento de algunas proteínas matriciales, semejantes a las encontradas en las células somáticas, que podrían ser importantes en la conformación del núcleo del espermatozoide.

El ADN en una célula somática, tanto en reposo como cuando se estructura para formar cromosomas durante la mitosis, esta empaquetada en un primer nivel formando nucleosomas, en los cuales el ADN esta envuelto, formando dos asas completas (200 pares de nucleótidos), alrededor de un nucleo octamérico de histonas (McGhee y Felsenfeld, 1980). La continuidad de la cadena de ADN establece, al terminar su arrollamiento sobre un nucleosoma, un puente que une los nucleosomas entre sí. Esta estructura, llamada en collar de perlas, puede ser posteriormente superestructurada para formar un solenoide (Finch y Klug, 1976). Debe tenerse en cuenta, sin embargo, que este tipo de empaquetamiento requiere una gran cantidad de espacio, primero porque los octámeros de histona ocupan un volumen importante, y después porque el enrollamiento y superenrollamiento dejan espacios considerables en el interior de las vueltas (Pienta y Coffey, 1984).

La espermiogénesis es un proceso morfo-genético complicado durante el cual la espermátide, a través de una serie intrincada de modificaciones morfo-bioquímicas, da origen al espermatozoide. Entre estos cambios destacan las modificaciones que experimenta el núcleo, el cual de esférico se transforma en un cuerpo pequeño,

aplanado con una forma que es más o menos característica de cada especie. Por otro lado, la cromatina, difusa en la espermátide, adquiere durante este proceso su aspecto compacto y su estructura notablemente condensada. El núcleo del espermatozoide del ratón posee un volumen 40 veces más pequeño que el núcleo de una célula hepática (Wyrobek y col, 1976; Pogany y col, 1981), sin embargo, en este pequeño espacio debe acomodarse la mitad de la cantidad de ADN presente en una célula somática. Usando los cálculos de Pienta y Coffey (1984), se puede encontrar que el núcleo del espermatozoide de ratón es seis veces más condensado que el ADN de un cromosoma mitótico, lo cual hace al ADN del espermatozoide la forma más condensada de ADN en las células eucariotas.

Si bien es cierto que el volumen nuclear de las células somáticas es suficiente para contener la cantidad adecuada de ADN constituida en esta estructuración nucleosomal, el volumen del núcleo del espermatozoide es tan reducido que los cálculos indican que si la organización del ADN de la célula espermática se hiciera de la misma manera que en las células somáticas, es decir en estructuras del tipo nucleosoma, se requeriría un volumen más de dos veces superior (213%) del que se dispone en la cabeza del espermatozoide (Pogany y col, 1981), es pues fácil concluir que el ADN del espermatozoide debe estar empaquetado de una manera totalmente diferente, como ha sido fehacientemente demostrado en la última década (Balhorn, 1982; Hernández-Pérez y Rosado, 1988; Ballesteros y col, 1988; Ward y Coffey, 1989).

Se ha demostrado que existen diferencias importantes entre las propiedades fisicoquímicas del ADN del espermatozoide y el de una célula somática (Leucocito) (Hernández-Pérez y Rosado, 1988; Ballesteros y col, 1988). Estas diferencias son: La relación de absorbancia 260/230, el valor de T_m y el contenido de G+C son mayores para el ADN del espermatozoide que para el ADN del leucocito. La densidad de flotación indicó la presencia de una cantidad importante del ADN en un componente satélite, que no pudo ser identificado en el ADN de los leucocitos. La cinética de reasociación del ADN del espermatozoide mostró un contenido de 12.1% de secuencias altamente repetitivas, mientras que el ADN del leucocito mostró solo 9.2%. Las secuencias únicas constituyeron 64% del ADN del leucocito y 59% para el ADN del espermatozoide.

Existe en la actualidad suficiente evidencia para asegurar que la organización nucleosomal de la cromatina en las células somáticas depende solo de la presencia de la cadena de ADN y de las cuatro histonas básicas, H3, H4, H2a y H2b. Es bien sabido

que durante la espermiogénesis el complemento de histonas de la cromatina espermática es drásticamente modificada, las histonas de la cromatina espermática son substituidas por proteínas específicas llamadas protaminas, en el espermatozoide humano únicamente el 15% de las proteínas básicas de la nucleoproteína espermática han sido identificadas como histonas (Tampaichitr y col, 1978)

Todas estas diferencias permitirían postular que en la asociación ADN/proteínas básicas que constituyen la estructuración nuclear en el esperma, el ADN debe desempeñar un papel importante, no tan pasivo como el que parece desempeñar en la estructuración del nucleosoma. Esta actividad organizacional del ADN podría ser demostrada por los experimentos de Gatewood y col (1987) quienes demostraron que secuencias específicas del ADN se encuentran selectivamente asociadas con las histonas que permanecen en la cromatina, lo cual sugiere que los dos tipos de asociación ADN/protaminas y ADN/histonas son funcionalmente diferentes y también que esta especificidad es determinada por el ADN.

Para explicar los mecanismos que determinan la adquisición de la forma característica del núcleo y, por lo tanto, de la cabeza del espermatozoide en las diferentes especies se han propuesto cuatro hipótesis. Hasta el momento actual no hay ninguna evidencia directa que apoye, o desmienta, ninguna de estas hipótesis:

- (1) El anulus o anillo nuclear, junto con los microtúbulos que constituyen la llamada "manchette" podrían ser los factores determinantes, sin embargo, la evidencia que se ha propuesto hasta la fecha parecería indicar que, si estas estructuras desempeñan algún papel, estarían solo implicados en la elongación y conformación de la región post-acrosomal del espermatozoide (Ward y Coffey, 1989)
- (2) Una de las estructuras importantes que forman la interrelación entre la espermátide y la célula de Sertoli es la llamada "envoltura" (mantle), la cual está constituida por un conjunto de filamentos ectoplásmicos que contienen actina y que rodean la porción anterior del núcleo de la espermátide, ha sido propuesta como un factor de importancia en la determinación de la forma y la estructuración de la cabeza del espermatozoide (Vogl y Soucy, 1985)
- (3) Las fuerzas que determinan el modo de agregación de los complejos ADN-nucleoproteínas, determinan por un lado la estructuración nuclear y este proceso de

condensación se refleja en la adquisición de la forma característica del núcleo (Fawcett y col, 1971; Ballesteros y col, 1988).

- (4) En el espacio subacrosomal de las espermátides que inician su proceso de elongación y en la región post-acrosomal de los espermatozoides se ha descrito la presencia de numerosos filamentos que contienen actina y que se ha propuesto podrían desempeñar un papel importante en la conformación de la cabeza espermática (Welch y O'Rand, 1985)
- (5) Recientemente se ha demostrado que en las células somáticas los solenoides cromatínicos están organizados espacialmente por su fijación, aproximadamente cada 60 000 pares de bases del ADN, a una estructura proteica llamada matriz nuclear, esta fijación contribuye a formar dominios o asas que parecen tener gran importancia en el funcionamiento del ADN. Por ejemplo se sabe que la duplicación del ADN se inicia en sitios de fijación a la matriz (Pardoll y col, 1980; Vaughn y col, 1990), que la organización de la matriz es diferente en varios tipos celulares y varía con el estado funcional de la célula (Fey y Penman, 1988; Getsenberg y col, 1990), que los genes activos se encuentran específicamente asociados con la matriz nuclear y que su transcripción adecuada depende de esta fijación (Stief y col, 1989)

Varios investigadores han demostrado que es posible aislar de núcleos de espermatozoides una estructura semejante a la matriz nuclear de las células somáticas (Rodman y Pruslin, 1985) y que esta estructura es capaz de organizar el ADN en dominios o asas que parecen ser notablemente diferentes a los dominios o asas determinados en las células somáticas (Ward y col, 1989) siendo notablemente más cortas (50%) y por supuesto no enrolladas ni superenrolladas. Sin embargo hasta ahora no se ha determinado el papel que la matriz nuclear podría desempeñar en la estructuración del núcleo espermático en los mamíferos, aspecto que debe ser considerado de la mayor importancia por la posición de la matriz como determinante de los sitios de replicación, los cuales se encuentran bloqueados en el espermatozoide.

Una vez realizada la penetración del espermatozoide al interior del ovocito, todo este cuidadoso programa de empaquetamiento y estructuración del núcleo espermático, que toma al organismo masculino un tiempo, variable según la especie, pero siempre considerable, debe ser revertido en cuestión de minutos.

DESCONDENSACION NUCLEAR DEL ESPERMATOZOIDE.

El primer cambio visible que ocurre en el núcleo del espermatozoide después de su incorporación en el huevo, es el rompimiento de la envoltura nuclear, la cual a diferencia de las células somáticas no posee poros en toda la superficie, a excepción de su región posterior. El rompimiento de la membrana comienza al nivel del segmento ecuatorial y continúa hacia las partes anterior y posterior. El material perinuclear (teca) (Olson y Winfrey, 1988) comienza a mezclarse con el citoplasma antes de que la descondensación del núcleo se haga aparente. La velocidad de la descondensación varía entre las especies. En el hámster dorado, por ejemplo, la descondensación se hace aparente primero en la parte media del núcleo espermático aproximadamente 20 minutos después de la fusión del espermatozoide con el ovocito y se completa en los siguientes 40 minutos (Barros y Yanagimachi, 1972). Los factores citoplásmicos que causan la descondensación nuclear espermática y el desarrollo de pronúcleo, parecen no ser especie específicos. Por ejemplo, el núcleo del espermatozoide humano puede descondensarse y transformarse en un pronúcleo masculino aparentemente normal en los ovocitos de hámster, ovocitos de rana (Ohsumi y Col, 1986) y extractos de ovocitos de rana (Brown y Col, 1987). Y más aun, aunque muy deficientemente, algunas células somáticas pueden inducir descondensación (Johnson y Col, 1970) y síntesis de DNA en el núcleo del espermatozoide.

MECANISMOS DEL ROMPIMIENTO DE LA ENVOLTURA NUCLEAR.

La naturaleza del factor responsable de la rápida desintegración de la envoltura nuclear del espermatozoide es desconocida. Se podría especular que fosfolipasas originadas en el espermatozoide jugaran un papel importante al respecto (Weiman y Col, 1986), pero no existe una evidencia concreta a este respecto. De acuerdo a Berrios y Bedford (1976), los espermatozoides de conejo y ratón que se han fusionado con ovocitos inmaduros en la etapa de GV, retienen sus envolturas nucleares intactas, por lo que se infiere que los ovocitos inmaduros carecen de la habilidad de romper la envoltura nuclear. Las observaciones de Usui y Yanagimachi (1976) contradicen lo anterior. Por lo menos en el hamster la envoltura nuclear intrínseca desaparece rápidamente; luego una

nueva envoltura (sin poros y que recuerda la envoltura intrínseca nuclear) rodea a cada núcleo. Esta misma secuencia de eventos ocurre cuando el espermatozoide se fusiona con ovocitos fertilizados en las etapas de pronúcleo o dos células. Aún cuando el rompimiento de la envoltura nuclear parece ser un evento preliminar para la descondensación del núcleo del espermatozoide y el desarrollo subsecuente en un gran pronúcleo, el rompimiento de dicha envoltura no necesariamente conduce a la descondensación nuclear.

MECANISMOS DE LA DESCONDENSACION NUCLEAR DEL ESPERMATOZOIDE.

Un indicio del mecanismo de la descondensación nuclear del espermatozoide fue obtenido en 1971 cuando Calvin y Bedford, reportaron que el núcleo espermático de los mamíferos podía descondensarse rápidamente en un medio simple conteniendo ditioneitol (DTT), un agente reductor de puentes disulfuro y dodecil-sulfato de sodio (SDS), un detergente aniónico. Al mismo tiempo otros investigadores (Ecklund y Levine, 1975) demostraron que el núcleo del espermatozoide pierde protaminas rápidamente después de su entrada en el citoplasma. Todo esto, más estudios subsecuentes han conducido a la creencia que la reducción de los puentes disulfuro en las protaminas nucleares y el remplazamiento de las protaminas por histonas están directamente involucradas en la descondensación nuclear del espermatozoide en el ooplasma.

REEMPLAZO DE LAS PROTAMINAS POR HISTONAS.

Cuando un espermatozoide entra en un ovocito, las protaminas son remplazadas por histonas en los primeros 5 minutos. Este remplazo se lleva a cabo, probablemente, por competencia intermolecular entre el DNA y las protaminas por la nucleoplasmina. La nucleoplasmina es la proteína más abundante en la matriz nuclear (sap). Esta gran cantidad es liberada en el ooplasma a partir del núcleo del ovocito durante el rompimiento de la envoltura de las vesículas germinales. Antes de entrar a los ovocitos maduros, el DNA de los espermatozoides está fuertemente unido a las protaminas. Cuando un núcleo espermático penetra a un ooplasma rico en nucleoplasmina, las protaminas abandonan el DNA debido a su fuerte afinidad por la nucleoplasmina. Entonces el DNA liberado se une a las histonas, las cuales son abundantes en el ooplasma (Philpott y Lend, 1992). De acuerdo a Ito y col. (1993), el núcleo del

espermatozoide humano tratado con DTT, pierde protaminas y se descondensa dentro de los 30 minutos después de haberlo expuesto a la nucleoplasmina de sapo in vitro. Aparentemente la unión entre la nucleoplasmina y la protamina no es especie específica.

Los mamíferos euterios difieren de otras especies tales como la rana en que los puentes disulfuro deben ser reducidos antes de que las protaminas puedan ser substituidas por las histonas. Parece no haber duda que la reducción de estas ligaduras es llevado a cabo por el glutatión reducido (GSH) que es muy abundante en el ooplasma de los ovocitos maduros. El hecho de que el ooplasma de los ovocitos inmaduros es incapaz de descondensar el núcleo del espermatozoide (Perreault y Barbee, 1986) parece ser debido más a una deficiencia de substancias como la nucleoplasmina, que a una deficiencia en GSH, puesto que su concentración en ovocitos inmaduros es alta (4-6mM), aunque ligeramente menor que en los ovocitos maduros ovulados (8-10mM). De hecho las protaminas espermáticas suelen ser reducidas dentro de los 30 primeros minutos en el citoplasma de los ovocitos inmaduros.

DESCONDENSACION NUCLEAR DEL ESPERMATOZOIDE IN VITRO.

La inducción de la descondensación nuclear del espermatozoide puede ser realizada sin la presencia del ooplasma. Un medio simple conteniendo un detergente aniónico y DTT (o mercaptoetanol), por ejemplo, puede inducir la descondensación nuclear de una manera muy eficiente (Bedford y Calvin, 1974). De acuerdo a Jager y col. (1990), la heparina y algunos otros poli aniones (ej. sulfato de condroitina) pueden descondensar el espermatozoide humano lentamente. La heparina más DTT es capaz de descondensar el núcleo espermático muy rápidamente. Aun los núcleos de los espermatozoides de toro y raton, que no son capaces de responder a la heparina sola, son capaces de hacerlo en heparina más DTT. Jager y col, infirieron que la heparina remueve las protaminas de la cromatina espermática. Por lo tanto la heparina y algunos polianiones pueden mimetizar a la nucleoplasmina en la liberación del DNA espermático de las protaminas. Aun cuando Reyes y col. (1989) mantienen que la heparina y el glutatión reducido son factores descondensantes del núcleo naturales, es posible que sea la nucleoplasmina y no la heparina per se, la que contribuye a la descondensación nuclear del espermatozoide dentro del ooplasma. Algunos investigadores han sugerido

la posible implicación de proteasas asociadas al núcleo en la descondensación nuclear, basadas en la observación de que los medios que contienen DTT o mercaptoetanol como proteasas pueden causar una descondensación extensa del núcleo espermático. Tanto la presencia real de proteasas en núcleo, proteasas endógenas, como la verdadera actividad de estas proteasas en la descondensación nuclear durante la fertilización normal, continúan siendo preguntas sin respuesta.

222470

OBJETIVO

El proposito de este estudio fue desarrollar una prueba estandarizada para cuantificar el proceso de la descondensación nuclear en humanos, usando el metodo de incubación con DTT/SDS seguido de la observación simple de la cinética de descondensación por microscopia óptica. Pensamos que este estudio podria ser usado cuando otros metodos fallan para diagnosticar la infertilidad masculina de etiología desconocida o idiopática.

MATERIAL Y METODOS.

Este estudio fue realizado en 21 eyaculados obtenidos de nueve donadores sanos, entre 20 y 37 años de edad, cuya fertilizante fue establecida por una cuidadosa historia clínica, particularmente enfocada a la obtención de datos relacionados con su vida familiar y el establecimiento cuidadoso de su capacidad de paternidad al menos en el lapso de un año. anterior.

Los eyaculados fueron obtenidos por masturbación, anteceditos por dos días de abstinencia. Después de 30 minutos de incubación a 37° C para permitir la licuefacción seminal, se cuantificó el número de espermatozoides, su viabilidad y su movilidad. La morfología espermática también fue observada en frotis teñidos con la tinción de Papanicolau modificada (Chavarria y Reyes, 1991). Sólo aquellos eyaculados que mostraron valores normales de acuerdo a los parámetros propuestos por la World Health Organization fueron incluidos en este estudio (WHO, 1987). Puesto que el estudiar muestras seminales de un grupo de donadores puede dar resultados muy confusos sobre la descondensación nuclear debido a la variación individual, se decidió hacer todos los estudios, utilizando exclusivamente muestras individuales.

Inmediatamente después de la licuefacción, las muestras fueron centrifugadas a 600Xg durante 10 minutos, lavados dos veces y resuspendidos en medio BWW (Biggers y col (1973) a una concentración celular fija de 50 millones por ml.

La capacitación se llevo a cabo sometiendo las muestras lavadas a 6 horas de incubación a 37° C en atmosfera de CO₂ al 5%.

La descondensación in vitro se realizo de acuerdo al metodo propuesto por Rodríguez y Col. (1985), pero aumentando el número de tiempos a los cuales fueron realizadas las observaciones, esta modificación aumenta el tiempo que se debe dedicar al estudio de cada muestra, pero en cambio permite precisar la cinética del proceso de descondensación nuclear. Cada muestra individual fue sometida a dos estudios:

- 1) descondensación realizada en los espermatozoides al tiempo inicial o sea, antes de la capacitación, utilizando el semen recién eyaculado y lavado, después de la licuefacción

- 2) descondensación realizada en la fracción que pasó por el proceso de capacitación durante 6 horas.

Para llevar a cabo la reacción, la suspensión de espermatozoides fue incubada con una solución de DTT 2 mM en amortiguador de borato 0.05 M, pH 9.0, a temperatura ambiente durante 45 minutos. Este tiempo es considerado como el tiempo cero para la cinética de la reacción. Se añade una solución de SDS para obtener una concentración final de 0.5%. La reacción fue detenida por la adición de glutaraldehído de sodio al 6.5% en buffer de borato de sodio pH 9.0 sobre alícuotas tomadas a los 0, 2, 5, 10 y 15 minutos después de la adición del SDS.

La descondensación fue observada en un microscopio Zeiss de contraste de fases con el objetivo seco fuerte, 40X.

Inicialmente decidimos contar 100 y 400 células, por cada muestra, pero como no se encontró una diferencia significativa entre ambos sistemas de conteo se decidió contar subsecuentemente solo 100 de manera rutinaria. La clasificación de los núcleos descondensados se llevo a cabo siguiendo el criterio propuesto por Gopalkrishnan y Col. (1991).

Para observar la variación intra individual en la cinética de descondensación, se realizaron 5-6 estudios de diferentes muestras donadas por un mismo individuo. En este estudio participaron dos donadores diferentes.

También se estudió la variación intramuestra, analizando 6 réplicas del mismo eyaculado en estudios independientes, las diferentes alícuotas utilizadas fueron obtenidas de la misma muestra. En este estudio participaron tres donadores diferentes.

RESULTADOS.

Desde un principio debemos hacer notar que el problema más frecuentemente enfrentado en los estudios de descondensación de la cromatina en humanos es la cuantificación adecuada del proceso. Debido a su naturaleza asincrónica y progresiva, la identificación de las etapas iniciales de descondensación puede ser ardua. Por lo tanto, se consideró importante realizar el método de doble ciego (Huret, 1983) y la cuantificación del proceso en diferentes tiempos después de la adición del reactivo utilizado para el rompimiento de los puentes disulfuro.

La cuantificación de la descondensación de la cromatina del espermatozoide por microscopía de contraste de fase en muestras sin teñir es un procedimiento difícil y fatigoso, pero permite hacer una distinción entre los diferentes grados de descompactación nuclear y permite una apreciación del número real de espermatozoides descondensados aún en las etapas iniciales de la descondensación.

La variación intra muestra fué casi nula, lo que indica que la metodología aquí descrita es simple y confiable y por lo tanto sencilla de aplicar como prueba de rutina en el laboratorio clínico como medio de diagnóstico relacionado con la infertilidad. Nuestros resultados, sin embargo, son también indicativos de que las variaciones intra e interindividuales son reales y podrían comprometer la utilidad de la cuantificación de la capacidad de descondensación como medio para establecer la capacidad fertilizante de una muestra de semen dada.

La figura 1 muestra la evolución promedio de la descondensación de la cromatina en los 21 eyaculados estudiados. Puede observarse que en el caso de los espermatozoide no capacitados, dos minutos después de haberse iniciado la incubación en la presencia de SDS, es posible observar claramente la iniciación del proceso de descondensación en el 22% de los espermatozoides incubados. Este porcentaje aumenta paulatinamente con el aumento del tiempo de incubación, alcanzando casi un 60% después de 15 minutos. Por el contrario, el espermatozoide capacitado mostró más resistencia a la capacidad

descondensante del SDS, tanto a los 2 minutos de incubación, como a la descondensación dependiente del tiempo bajo la acción del detergente (Fig. 1). Sin embargo los valores calculados del error estandar, particularmente en los tiempos más largos de incubación, indican la presencia de una variación inter-individual importante.

Las figuras 2 y 3 muestran los resultados obtenidos por los estudios de la descondensación de la cromatina en varias (4 en el caso del sujeto 9 y 6 en el caso del sujeto numero 10) muestras independientes obtenidas del mismo donador. Es posible observar que después de varias repeticiones el estudio de los valores promedio individuales obtenidos durante el proceso temporal de la descondensación no muestra diferencias significativas con el valor promedio obtenido por el análisis del total de las muestras proceso (Fig. 1). Sin embargo cuando son observadas las muestras independientes (Fig. 4) puede ser detectada una gran variación intra individual, aún cuando la tendencia general y las diferencias en comportamiento entre espermatozoides capacitados y no capacitados.

DISCUSION.

Después de un breve periodo de transición, durante la espermatogénesis, las histonas somáticas del núcleo de las espermátidas de los mamíferos son substituidas por protaminas básicas especie específicas. El rearrreglo de la cromatina espermática, debida a esta substitución parece ser responsable del incremento en la compactación del núcleo espermático y la supresión de su actividad transcripcional (Poccia, 1986). Durante la maduración epididimaria esta restructuración continúa y finalmente el núcleo espermático adquiere su resistencia característica a la ruptura, ya sea por metodos químicos o físicos (Marushige y Marushige, 1974; Yanagimachi y col. 1992). Esta estabilidad tan característica, parece ser debida a la presencia de entrecruzamientos S-S entre los residuos de cisteína de las protaminas, durante las ultimas etapas de la maduración epididimaria del espermatozoide (Calvin y Bedford, 1971; Bedford y Calvin, 1974).

A pesar de su característica estabilidad in vitro, el núcleo del espermatozoide, una vez que penetra al citoplasma del ovocito, rápidamente descondensa su cromatina para dar lugar a la formación del pronúcleo masculino. Es obvio que el ooplasma posee un mecanismo muy eficiente para producir esta descondensación. Cualquier impedimento para que ocurra una apropiada descondensación nuclear y por lo tanto la formación del pronúcleo, puede ser considerada como una posible causa de infertilidad masculina.

Por estas razones ha sido propuesto que el estudio de la descondensación in vitro del núcleo espermático podría ser un método simple y factible para predecir la habilidad fertilizante de las muestras de semen (Rodríguez y col. 1985, Gopalkrishnan y col. 1991). La cromatina espermática puede ser descondensada in vitro por varios tratamientos específicos (Delgado, 1980), incluyendo la incubación con un agente reductor de los puentes disulfuro, como el ditioneitol (DTT), junto con un detergente, el dodecilsulfato de sodio (SDS) (Calvin y Bedford, 1971; Huret, 1983).

La infertilidad masculina es uno de los problemas más importantes en andrología. Algunos autores, así como la Organización Mundial de la Salud (WHO) han intentado definir las características de una muestra normal de semen, sin embargo, aún cuando la meta principal del análisis seminal es predecir la habilidad de una muestra dada, hasta ahora no hay pruebas específicas que hayan proporcionado con exactitud este objetivo. Las anomalías en la compactación del núcleo espermático, que deberá ser seguido por una ineficiencia en el proceso de descondensación, una vez que la fertilización se lleva a cabo, ha sido relacionado con la infertilidad, tanto in vivo como in vitro (Heidl y Schill, 1994), reabsorción embrionaria y aborto temprano. También ha sido reportado que, bajo las condiciones in vitro (incubación en la presencia de DTT más SDS, el núcleo espermático de hombres normales y fértiles descondensa en menor grado y más lentamente que los espermatozoides obtenidos de sujetos clínicamente infértiles. Estas diferencias pueden ser relacionadas a modificaciones en el proceso de estructuración nuclear durante la maduración epididimaria del espermatozoide: el espermatozoide con formación inadecuada de puentes disulfuro, se descondensará bajo condiciones inadecuadas para la formación normal del pronúcleo (Schubeus y col, 1986; Perreault y col, 1987; Windt y col, 1994).

La capacidad del espermatozoide para llevar a cabo la fertilización del ovocito consiste de una secuencia de eventos que culminan, después de la penetración espermática en el ooplasma, en la descondensación de la cromatina espermática y la formación del pronúcleo masculino. Recientemente se ha venido aceptando que la estructura normal, empaquetado y estabilidad del DNA en la cromatina espermática juega un papel indispensable en la capacidad del espermatozoide para llevar a cabo exitosamente la fertilización (Rodríguez y col. 1985; Royere y col. 1991; Haidl y Schill, 1994; Windt y col. 1994).

A pesar del creciente número de reportes de investigación, pertinentes tanto a la descondensación nuclear como a la capacitación del espermatozoide humano, la posible interdependencia entre ambos procesos ha sido inexplicablemente, hasta este momento, poco estudiada.

Los investigadores que iniciaron el estudio de la capacitación in vitro utilizaron varios fluidos biológicos (Vgr. del oviducto, líquido folicular, suero sanguíneo) para realizarla. La composición de estos fluidos era tan compleja que fue difícil determinar cuales componentes estaban involucrados en la inducción o soporte de la capacitación. Desde que Toyoda y col. (1990) reportaron la primera fertilización in vitro exitosa (IVF) de los ovocitos de ratón, usando un medio "químico definido", los análisis de la capacitación in vitro, pasaron a ser considerablemente más fáciles. El medio más comúnmente usado actualmente para la fertilización y la capacitación in vitro consiste de alguna modificación de las soluciones de Tyrode o Krebs-Ringer, habitualmente suplementados con algunos metabolitos que funcionen como fuentes de energía apropiadas (Vgr. glucosa, lactato y piruvato) y con albúmina. También son usados, particularmente para la realización de la IVF, los medios de cultivo para tejidos (ej. Ham, F-10), suplementados con suero sanguíneo. Hasta la fecha no ha sido posible encontrar un solo medio que sea capaz de favorecer la capacitación in vitro de las células espermáticas de todas las especies. Los espermatozoides y ovocitos de cada especie parecen requerir su propio ambiente específico para poder realizar sus funciones más eficientemente. Esto es comprensible, puesto que los gametos y microambientes del tracto femenino han tenido una evolución independiente en cada especie. Esta falta de entendimiento de los mecanismos que intervienen en la capacitación seguramente depende, al menos en parte, de que la meta principal para muchos investigadores que

han estado involucrados en el desarrollo y aplicación de los métodos de reproducción animal asistida, particularmente de la IVF, ha sido trabajar bajo las mejores condiciones para asegurar el éxito de la fertilización de los ovocitos y no detenerse a analizar los mecanismos bio-físico-químicos que participan en la capacitación espermática.

Aunque la información obtenida de estos investigadores puede ser muy valiosa, se debe ser cauto para interpretar sus conclusiones, por lo menos respecto a la capacitación del espermatozoide. Por ejemplo, muchos investigadores concluyeron que ciertos reactivos bloqueaban la capacitación espermática completamente, porque la fertilización in vitro no se lleva a cabo de manera satisfactoria en presencia de estos reactivos. Sus conclusiones podían ser correctas o no serlo, porque la capacitación no es el único requerimiento del espermatozoide para una fertilización exitosa. Para fertilizar los ovocitos, el espermatozoide debe poseer una gran movilidad, así como ser capaz de llevar a cabo la reacción acrosomal, penetrar las coberturas del ovocito y finalmente realizar la fusión con el mismo. Una fertilización in vitro exitosa implica, ciertamente, que el espermatozoide haya pasado por el proceso de capacitación. Sin embargo, una IVF sin éxito no implica necesariamente que la falta de éste sea debido a que el espermatozoide no fué capacitado.

Algunos investigadores han utilizado la reacción acrosomal (RA) como un indicador de que se ha realizado satisfactoriamente el proceso de capacitación, puesto que el espermatozoide no sufre la reacción acrosomal ya sea espontáneamente o mediada por ligandos (ej. zona pelúcida), a menos que previamente hayan sido capacitados, es por eso que la presencia de la RA puede ser utilizada como un indicador de que la capacitación se ha llevado a cabo de manera completa. Sin embargo, se debe ser muy cuidadoso, porque ha sido descrito que bajo condiciones desusadas o reactivos especiales puede inducirse la reacción acrosomal sin que, aparentemente, la capacitación se halla realizado de manera completa. Por el contrario, la ausencia de RA no significa que la capacitación no se haya llevado a cabo, un espermatozoide puede estar bien capacitado pero no llevar a cabo la reacción acrosomal. Podría esperarse que un 100% de espermatozoide incubados in vitro sobrevivieran y completaran su capacitación simultáneamente, pero la realidad es que muchos espermatozoides mueren antes de experimentar todas las fases implicadas en el proceso de capacitación. La posibilidad de muerte por senescencia o de capacitación del espermatozoide se realizan simultáneamente aún en las condiciones más favorables de incubación in vitro.

Esto significa que, a menos que estemos corroborando cuidadosamente la viabilidad de los espermatozoides durante el tiempo que dure su tratamiento *in vitro*, nuestros resultados finales dependerán tanto de la presencia de muerte por senescencia, como de capacitación *in vitro* (Storey, 1991).

La capacitación espermática es dependiente de la temperatura (Mahi y Yanahimachi, 1973). Una incubación a la temperatura de 37° C a 38° C, que es la usual en la mayoría de los laboratorios, aparentemente es la más adecuada para favorecer la capacitación en la mayoría de los casos. Sin embargo, es interesante hacer notar que la IVF en cerdo y oveja que alguna vez se penso que era muy difícil, actualmente puede ser llevada a cabo fácilmente, preincubando los espermatozoides a 39° C y/o mezclando los ovocitos con esperma fresco recién eyaculado y lavado, a esta misma temperatura (Cheng y Col, 1986). Finalmente en la oveja y el cerdo, la capacitación parece llevarse a cabo de una manera más eficiente a la temperatura natural del cuerpo de estos animales (38.7° C-39.7° C, media 39° C) que a 37° C o 38° C. Aún estas pequeñas diferencias de temperatura pueden hacer una gran diferencia en el estado físico de los lípidos membranales (Holt y North, 1986), lo cual es de una importancia crítica para la capacitación.

Los pocos estudios referentes al estado de la cromatina nuclear durante la capacitación *in vitro*, han encontrado resultados contradictorios. Nicolle y Col. (1985), reportaron una disminución considerable en la capacidad de tinción de la cromatina espermática con Feulgen en el núcleo del carnero, después de la incubación en secreciones uterinas, un procedimiento que presumiblemente conduciría a la capacitación espermática. Más recientemente Royere y col. 1991, reportaron que la capacitación *in vitro* de los espermatozoides humanos, tanto por swim-up a través de medio B2 (Menezo, 1976), o por incubación en fluido folicular preovulatorio, disminuye la estabilidad de la cromatina nuclear.

Estas observaciones contradicen otros resultados que muestran un aumento en la capacidad tintorial del DNA con Feulgen en el espermatozoide del carnero después de su paso por el tracto genital de la oveja (Nicolle y col. 1985). Resultados similares fueron obtenidos por Porcelli y Col. (1987), quien describe un aumento en el contenido DNA-Feulgen en la cromatina del espermatozoide de ratón durante su tránsito a través de la cavidad uterina hasta las trompas de Falopio. También Huret y Courtot (1984), reportaron que el espermatozoide humano mostraba una mayor estabilidad nuclear después de la capacitación *in vitro*.

Nuestros resultados muestran que la capacitación del espermatozoide humano *in vitro* aumenta la estabilidad de su cromatina a la capacidad descondensante del DTT más SDS *in vitro*. Este aumento en la estabilidad es pequeño, pero significativo, cuando la cuantificación de la descondensación se realiza sólo después de los dos minutos iniciales de incubación (Rodríguez y Col. 1985), pero puede ser claramente observado cuando el tiempo de incubación del espermatozoide con el detergente se prolonga.

Pensamos que los resultados contradictorios reportados hasta ahora acerca de la capacitación sobre la estabilidad de la cromatina del espermatozoide humano, puede ser debido fundamentalmente a deficiencias en la metodología seleccionada para el estudio.

222470

El semen humano contiene una población heterogénea de espermatozoides (Chavarria y Reyes, 1991). El porcentaje de espermatozoides considerados como normales de acuerdo a ciertas normas estructurales prefijadas, fué establecido por WHO (1987) como igual al 50% de las células espermáticas presentes en un eyaculado. Sin embargo, los valores reportados por varios laboratorios llegan a ser tan bajos como el 30% (Chavarria y Reyes, 1991). Esta variación es debida probablemente a diferencias en las técnicas de tinción, subjetividad en la evaluación y carencia de definiciones coherentes de las malformaciones. Las observaciones morfológicas realizadas en el semen normal humano, muestran que los defectos de cabeza figuran como las causas más frecuente de morfología espermática anormal: 35+18%. Esta gran variabilidad en la estructura cefálica podría, al menos en parte, explicar la importante variabilidad inter, y aún intra-individual, en la inducción de descondensación de la cromatina nuclear observada por nosotros (Bedford y col 1973; Kvist, 1980; Huret, 1983).

Sin embargo es conveniente recordar que la morfología no es un buen indicador de la normalidad cromosómica o nuclear del espermatozoide humano y que aparentemente no existe una correlación entre la frecuencia de formas anormales del espermatozoide y la presencia de anomalías cromosómicas, como ha sido señalado por Martin y Rademaker (1988), haciendo un seguimiento de la composición cromosómica del espermatozoide humano durante la descondensación nuclear observada después de la penetración de las células espermáticas en los ovocitos de hamster desnudos. También

es conveniente mencionar que algunos autores han reportado que no existe una variación intra-individual importante en la descondensación de la cromatina espermática humana. En efecto, Gopalkrishnan y Col. (1991) no encontraron una diferencia significativa en el porcentaje de espermatozoides de diferentes eyaculados obtenidos del mismo sujeto, cuando se induce su descondensación *in vitro*. También la evaluación de la descondensación, evaluada mediante la tinción con naranja de acridina, mostró un aceptable nivel de variabilidad del proceso en varios eyaculados obtenidos del mismo sujeto (Royere y Col,1991). La diferencia entre los resultados de estos autores y los nuestros, es con seguridad debida a diferencias importantes en la metodología y puntualiza la necesidad de establecer procedimientos estandarizados para la utilización de estas determinaciones en la atención de los enfermos con infertilidad idiopática. En un estudio paralelo realizado por Shubeus y Col (1986), el tiempo requerido para que el núcleo del espermatozoide humano fuera transformado en el pronúcleo masculino después de la penetración al ovocito desnudo de hámster, muestra una variación considerable entre los diferentes individuos estudiados, observándose que el tiempo máximo de descondensación varió desde 2, hasta más de 7 horas. Aún más, la transformación de los espermatozoides descondensados a pronúcleos requirió entre 3 y 5 horas más.

Nuestros resultados sugieren que repeticiones programadas del ensayo de descondensación *in vitro* en un mismo individuos podría proporcionar importantes resultados para aclarar algunos casos de esterilidad en los que la aplicación de las otras pruebas que se realizan en estos casos no pudiera dar datos válidos para el establecimiento de un diagnóstico etiológico.

FIGURA 1.

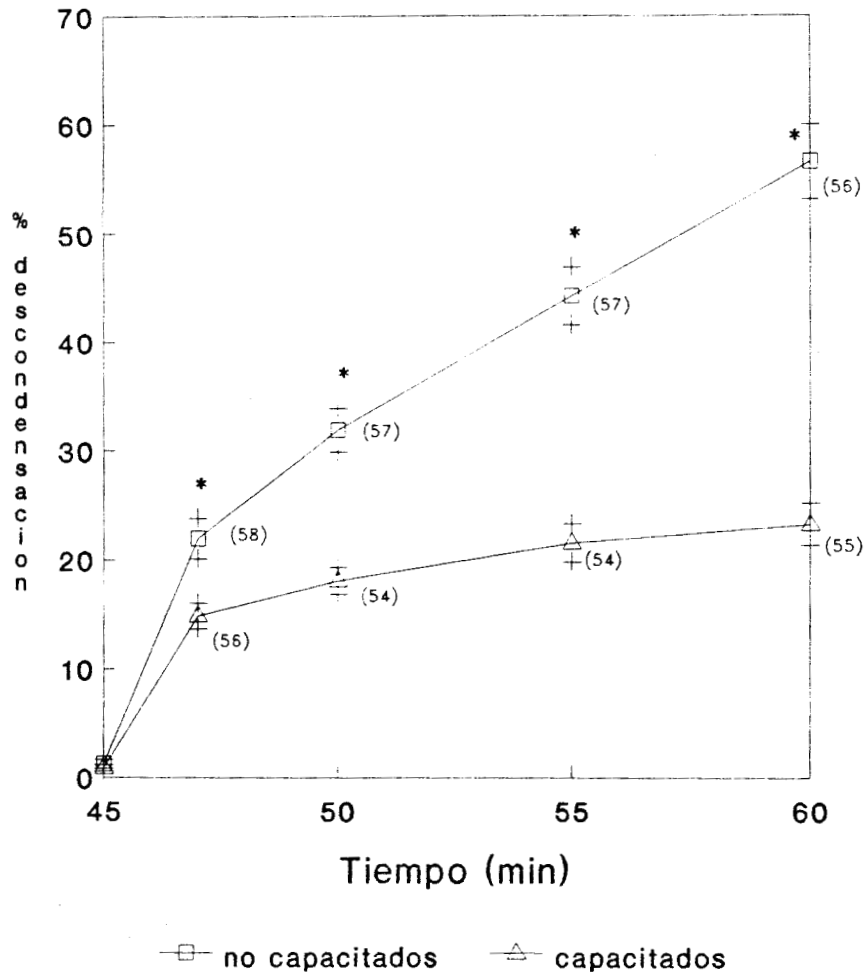
Evolución promedio de la descondensación de la cromatina en los 21 eyaculados estudiados en

- espermatozoides no capacitados y en
- Δ Espermatozoides capacitados.

Cada punto representa la media \pm el error estandar obtenido por el análisis del número de determinaciones indicado entre paréntesis. Puede observarse que dos minutos de incubación en presencia de DTT + SDS son suficientes para inducir una descondensación del 22% de los espermatozoides no capacitados. Este porcentaje aumenta paulatinamente con el aumento en el tiempo de incubación, alcanzando casi el 60% después de 15 minutos. Los espermatozoides capacitados mostraron mayor resistencia a la actividad descondensante de los agentes estudiados tanto después de los primeros dos minutos de incubación como al efecto descondensante dependiente del tiempo.

* indica la presencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los espermatozoides capacitados y los no capacitados

Los resultados estadísticos incluidos en el inserto representan los resultados de las pruebas de rango múltiple de ANOVA y Duncan para el efecto del tiempo sobre los espermatozoides no capacitados (izquierda) y capacitados (derecha).



ANALISIS DE VARIANZA

NO CAPACITADOS
Variable dependiente: % descondensación

FUENTE	F	g.l.	Pr>F
Tiempo	48.51	4, 244	0.0001

PRUEBA DE DUNCAN (COMPARACIONES MULTIPLES) ALFA= 0.06

TIEMPO(min)	Media	GRUPOS DUNCAN
60	56.68	A
55	44.28	B
50	31.90	C
47	21.96	D
45	1.23	E

Las medias con la misma letra no difieren significativamente

CAPACITADOS
Variable dependiente: % descondensación

FUENTE	F	g.l.	Pr>F
Tiempo	18.14	4, 235	0.0001

PRUEBA DE DUNCAN (COMPARACIONES MULTIPLES) ALFA= 0.06

TIEMPO(min)	MEDIA	GRUPOS DUNCAN
60	23.27	A
55	21.56	A B
50	18.10	C B
47	14.86	C
45	0.86	D

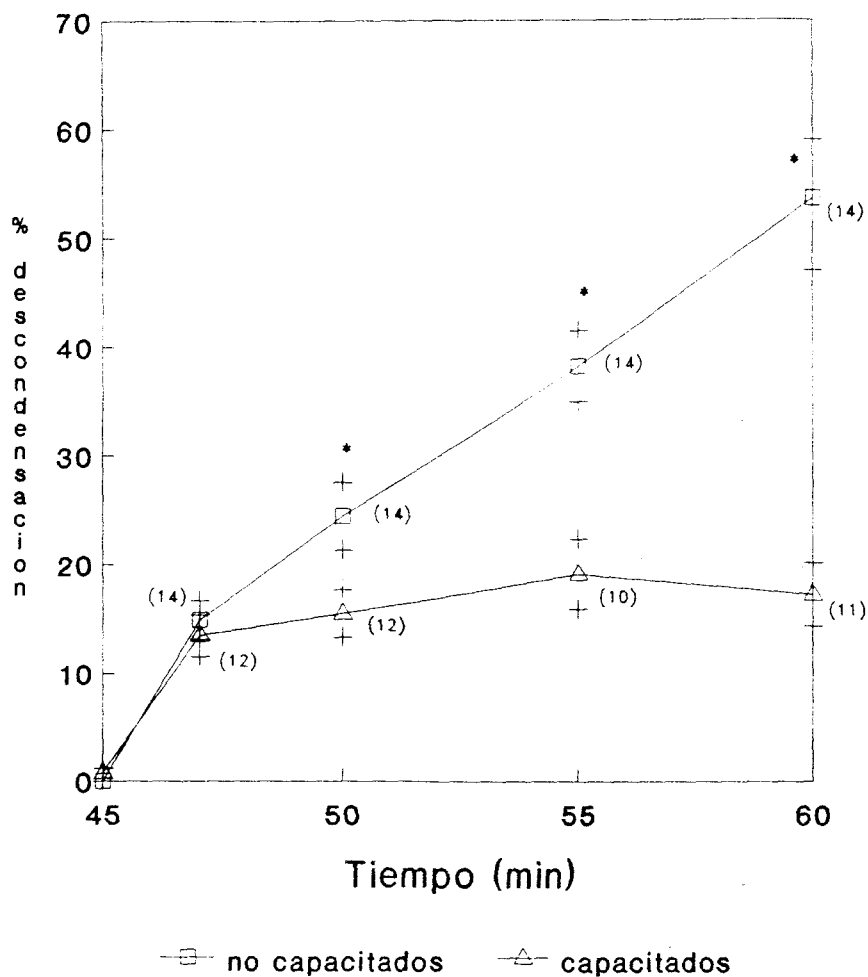
Medias con la misma letra no difieren significativamente

FIGURA 2.

Evolución promedio de la descondensación de la cromatina en 4 eyaculados independientes obtenidos de uno de los sujetos estudiados

- espermatozoides no capacitados
- Δ Espermatozoides capacitados.

Ver pie de la Figura 1.



ANALISIS DE VARIANZA

NO CAPACITADOS
Variable Dependiente: % descondensacion

FUENTE	F	g.l.	Pr>F
Tiempo	19.36	4, 66	0.0001

PRUEBA DE DUNCAN (COMPARACIONES MULTIPLES) ALFA= 0.06

TIEMPO(min)	Media	GRUPOS DUNCAN
60	53.00	A
55	38.29	B
50	24.43	C
47	14.93	C
45	0.00	D

Medias con la misma letra no difieren significativamente.

CAPACITADOS
Variable dependiente: % descondensación

FUENTE	F	g.l.	Pr>F
Tiempo	3.91	4, 44	0.0084

PRUEBA DE DUNCAN (COMPARACIONES MULTIPLES) ALFA= 0.06

TIEMPO(min)	Media	Grupos Duncan
60	17.27	A
55	19.1	A
50	16.50	A
47	13.60	A
45	0.75	B

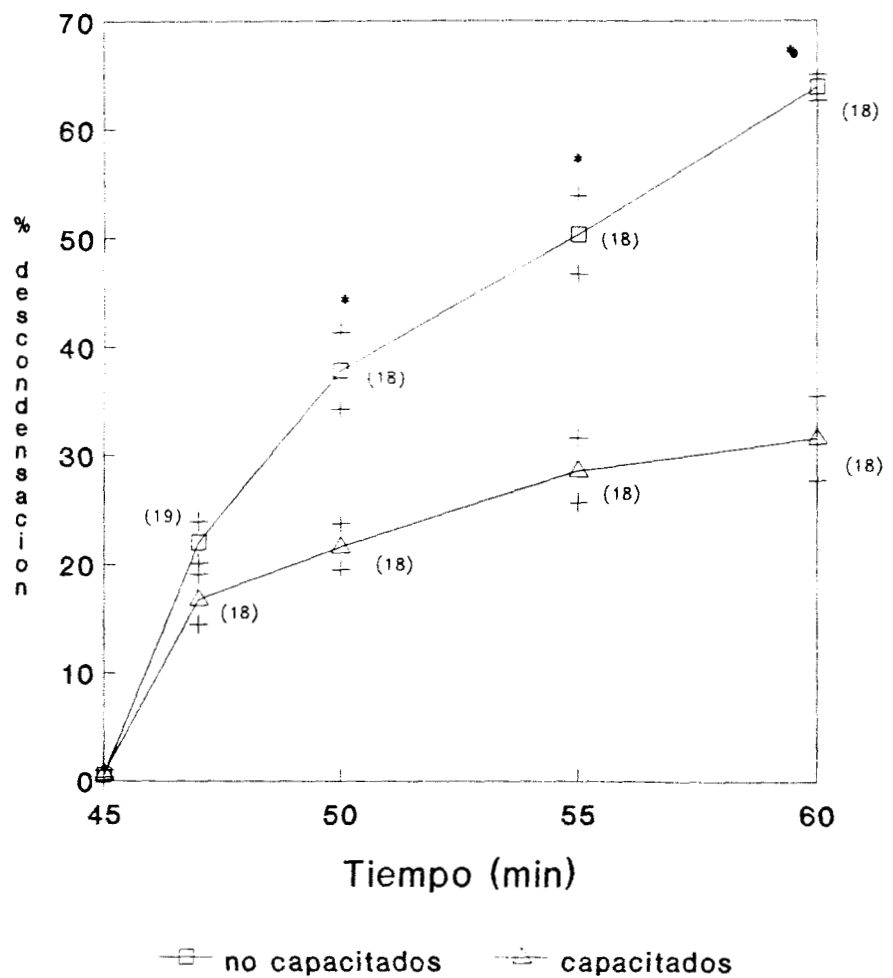
Medias con la misma letra no difieren significativamente

FIGURA 3.

Evolución promedio de la descondensación de la cromatina en 6 eyaculados independientes obtenidos de un sujeto diferente al presentado en la figura 2

- espermatozoides no capacitados
- Δ Espermatozoides capacitados.

Ver pie de la figura 1



ANALISIS DE VARIANZA

NO CAPACITADOS
Variable dependiente: % de condensación

FUENTE	F	g.l.	Pr>F
Tiempo	29.73	4, 74	0.0001

PRUEBA DE DUNCAN (COMPARACIONES MULTIPLES) ALFA = 0.05

TIEMPO(min)	Media	GRUPOS DUNCAN
60	63.89	A
55	50.39	B
50	37.83	C
47	22.05	D
45	0.50	E

Medias con la misma letra no difieren significativamente

CAPACITADOS
Variable dependiente: % de condensación

FUENTE	F	g.l.	Pr>F
Tiempo	9.81	4, 73	0.0001

PRUEBA DE DUNCAN (COMPARACIONES MULTIPLES) ALFA = 0.05

TIEMPO(min)	Media	GRUPOS DUNCAN
60	31.87	A
55	28.67	A B
50	21.61	C B
47	18.83	C
45	0.87	D

Medias con la misma letra no difieren significativamente

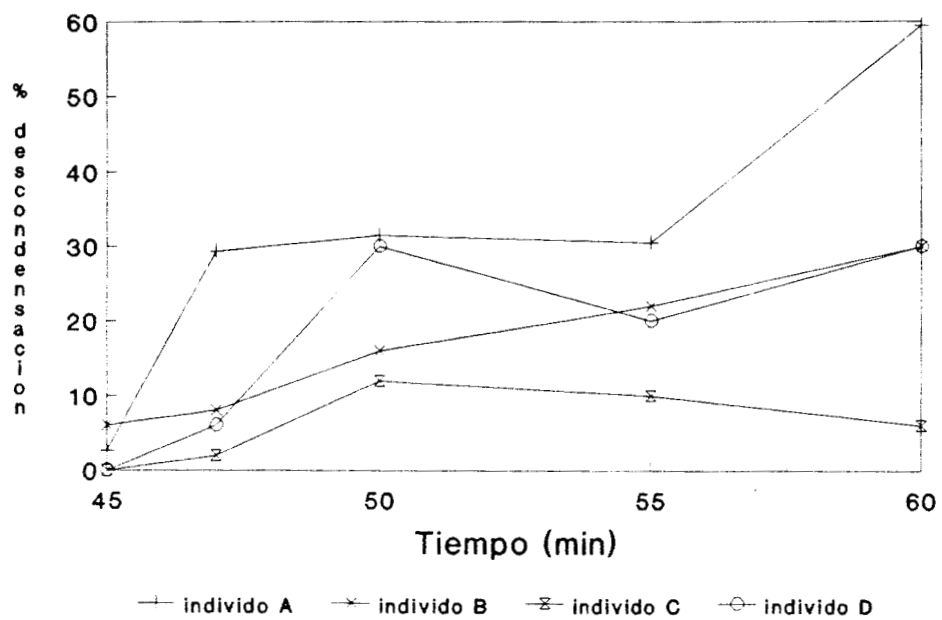
FIGURA 4.

Evolución promedio de la descondensación de la cromatina en 4 eyaculados independientes obtenidos de 4 sujetos diferentes

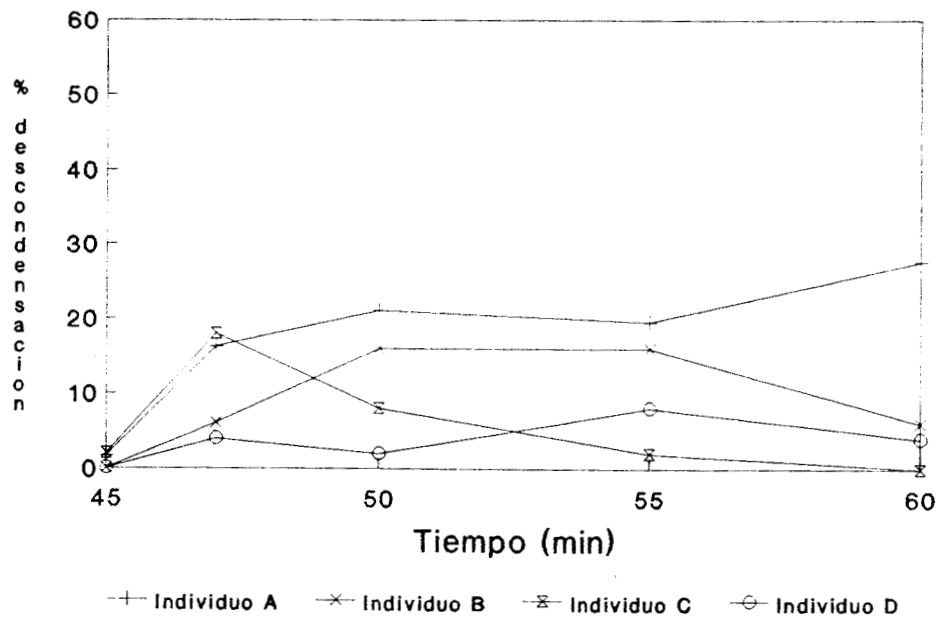
- 4A espermatozoides no capacitados
- 4B Espermatozoides capacitados.

En ambos casos es posible observar la existencia de una variabilidad interindividual importante.

Ver pie de la Figura 1.



NO CAPACITADOS



CAPACITADOS

BIBLIOGRAFIA

222470

1
2
3
4 Ashraff M., Peterson R.N., Rusell L.D. Activity and location of cation-dependent ATPases on the
5 plasma membrane of boar spermatozoa. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1982;107:1273.

6
7 Austin, C.R. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust. J. Sci.*
8 *Res. (B)* 1951;4:581-596.

9
10 Balhom R. (1982) A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J. Cell Biol.* 93:298-
11 305.

12
13 Ballesteros L.M., Delgado N.M., Rosado A. y Hernández-Pérez O. Structure of human sperm
14 chromatin. (1988). *Arch. Androl.* 19:63-71.

15
16 Barros C., Yanagimachi R. Polyspermy-preventing mechanisms in the golden hamster egg. *J. Exp.*
17 *Zool.* 1972;180:251-266.

18
19 Bearer E. L., Friend D. S. Morphology of mammalian sperm membranes during differentiation,
20 maturation and capacitation. *J. Electron Microsc. Technol.* 1990;16:281-297.

21
22 Bedford J.M. Changes in the electrophoretic properties of rabbit spermatozoa during passage
23 through the epididymis. *Nature* 1963;200:1178-1180.

24
25 Bedford J.M. Effects of duct ligation on the fertilizing ability of spermatozoa from different regions of
26 the rabbit epididymis. *J. Exp. Zool.* 1967;166:271-282.

27
28 Bedford J.M. Significance of the need for sperm capacitation in Eutherian mammals. *Biol. Reprod.*
29 1983;28:108-120.

30
31 Bedford J.M., Calvin H., Cooper G.W. The maturation of spermatozoa in the human epididymis. *J.*
32 *Reprod. Fertil.* 1973;(Suppl. 18):199-213.

33
34 Bedford J.M., Calvin, H.I. The occurrence and possible functional significance of -S-S- crosslinks in
35 sperm heads, with particular reference to eutherian mammals. *J. Exp. Zool.* 1974;188:137-156.

36
37 Bedford JM, Bent MJ, Calvin HI. (1973). Variations in the structural character and stability of
38 the nuclear chromatin in morphologically normal human spermatozoa. *J Reprod Fert* 33:19-29.

39
40 Bellve A.R., Chandrika R., Martinova Y.S., Barth A.H. The perinuclear matrix as a structural element
41 of the mouse sperm nucleus. *Biol. Reprod.* 1992;47:451-465.

42
43 Berrios M., Bedford J.M. Oocyte maturation: aberrant postfusion responses of the rabbit primary
44 oocyte to penetrating spermatozoa. *J. Cell Sci.* 1976;39:1-12.

45
46 Biggers JB, Whitten WK, Whittingham DG. (1973). The culture of mouse embryos in vitro. In:
47 Daniel JC, (Ed.) *Methods in mammalian embryology.* Freeman WH and Co. San Francisco. p.
48 86.

49
50 Blanchard Y., Lescoat D., Le Lannou D. Anomalous distribution of nuclear basic proteins in round-
51 headed human spermatozoa. *Andrologia* 1990;22:549-555.

52
53 Blobel C.P., Myles D.G., Primakoff P., White J.M. Proteolytic processing of a protein involved in
54 sperm-egg fusion correlates with acquisition of fertilization competence. *J. Cell Biol.* 1990;111:69-78.

55

- 1 Brackett B.G., Server J.B. Capacitation of rabbit spermatozoa in the uterus. *Fertil. Steril.*
2 1970;21:687-695.
- 3
- 4 Brown D.B., Blake E.J., Wolgemouth D.J., Gordon K., Ruddle F.H. Chromatin decondensation and
5 DNA synthesis in human sperm activated in vitro by using *Xenopus laevis* egg extracts. *J. Exp. Zool.*
6 1987;242:215-231.
- 7
- 8 Calvin H.I., Bedford J.M. Formation of disulfide bonds in the nucleus and accessory structures of
9 mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *J. Reprod. Fertil.* 1971;13(Suppl):65-75.
- 10
- 11 Calvin HI, Bedford JM. (1971). Formation of disulfide bonds in the nucleus and accessory
12 structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *J Reprod Fert* 13:65-
13 75.
- 14
- 15 Chang M.C. Fertilization capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature*
16 1951;168:697-698.
- 17
- 18 Chang M.C. The meaning of sperm capacitation. *J. Androl.* 1984;5:45-50.
- 19
- 20 Chavamia ME, Reyes A. (1991). Estudio comparativo de las características morfo-funcionales
21 de los espermatozoides de varones fértiles e infértiles y su relación con la habilidad fertilizante.
22 *Ginecología y Obstetricia de México.* 59: 229-237.
- 23
- 24 Cheng, WTK, Moore, RM, Polge, C. In vitro fertilization of pig and sheep oocytes matured in
25 vivo and in vitro. *Theriogenology* 1986;25:146
- 26
- 27 Cross N.L., Overstreet J.W. Glycoconjugates of the human sperm surface: Distribution and
28 alterations that accompany capacitation in vitro. *Gamete Res.* 1987;16:23-35.
- 29
- 30 Davis B.K. Inhibitory effect of synthetic phospholipid vesicles containing cholesterol on the fertilizing
31 capacity of the rabbit spermatozoa. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 1976;152:257-262.
- 32
- 33 Delgado N.M., Huacuja L., Pancardo R.M., Rosado A. Modification of human sperm metabolism by
34 the induced release of intracellular zinc. *Life Sci.* 1975;16:1483-1488.
- 35
- 36 Delgado NM, Huacuja L, Merchant H, Reyes R, Rosado A. (1980). Species specific
37 decondensation of human spermatozoa nuclei by heparin. *Arch Androl.* 4:305-313.
- 38
- 39 Dunbar B.S., O'Rand M.G. eds. *A Comparative Overview of Mammalian Fertilization.* New York:
40 Plenum Press: 1991.
- 41
- 42 Ecklund P.S., Levine L. Mouse sperm basic nuclear protein: electrophoretic characterization and fate
43 after fertilization. *J. Cell Biol.* 1975;66:251-262.
- 44
- 45 Eddy E.M., Koehler J.K. Restricted domains of the sperm surface. In: Johari O., ed. *Scanning*
46 *electron microscopy*, vol. 3. Chicago: SEM Inc. 1982:1313-1323.
- 47
- 48 Eddy E.M., O'Brien D.A. The spermatozoon. En: *The physiology of Reproduction*, 2nd edition. Eds.
49 Knobil E., Neill J.D. Raven Press Ltd. New York. 1994. 1er volumen Capítulo 2.
- 50
- 51 Eddy E.M., O'Brien D.A., Welch J.E. Mammalian sperm development in vivo and in vitro. In:
52 Wassarman P.M., ed. *Elements of mammalian fertilization.* vol. I, Basic concepts. Boca Raton: CRC
53 Press; 1991:1-28.
- 54
- 55 Evans RW, Weaver DE, Clegg, ED. Diacyl alkenyl and alkyl ether phospholipids in ejaculated, in utero
56 and in vitro incubated porcine spermatozoa. *J Lipid Res* 1980;21:223-228

- 1
2 Fawcett D.W., Anderson W.A. y Phillips D.M. Morphogenetic factors influencing the shape of the
3 sperm head. *Dev. Biol.* 1971 26:220-251.
4
5 Fawcett D.W. The mammalian spermatozoon. *Dev. Biol.* 1975;44:394-436.
6
7 Fellous M., Gachelin G., Buc-Caron M.H., Dubois P., Jacob F. Similar location of an early embryonic
8 antigen on mouse and human spermatozoa. *Dev. Biol.* 1974;41:331-337.
9
10 Feuchter F.A., Vernon R.B., Eddy E.M. Analysis of the sperm surface with monoclonal antibodies:
11 Topographically restricted antigens appearing in the epididymis. *Biol. Reprod.* 1981;24:1099-1110.
12
13 Fey E.G. y Penman S. Nuclear matrix proteins reflects cell type origin in cultured human cells *Proc.*
14 *Natl. Acad. Sci. USA* 1988;85:121-185.
15
16 Finch J.T. y Klug A. A solenoid model for superstructure in chromatin *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*
17 1976;73:1897-1901.
18
19 Friend D.S. Freeze-fracture alterations in guinea-pig sperm membrane preceding gamete fusion. In:
20 Gilula N.B., ed. *Membrane-membrane interactions.* New York. Raven Press;1980:153-165.
21
22 Friend D.S. Membrane organization and differentiation in the guinea-pig spermatozoon. In: Van
23 Blerkom J., Motta P.M., eds. *Ultrastructure of reproduction.* The Hague: Martinus Nijhoff;1984:75-85.
24
25 Friend D.S. Plasma-membrane diversity in a highly polarized cell. *J. Cell Biol.* 1982;93:243-249.
26
27 Friend D.S., Fawcett D.W. Membrane differentiations in freeze-fractured mammalian sperm. *J. Cell*
28 *Biol.* 1974;63:641-664.
29
30 Garcia R., Martínez R., Rábago M., Hernandez-Pérez O., Reyes A., Rosado A. Subcellular
31 distribution of phospholipase A2 and ATPases during capacitation and acrosome reaction in guinea
32 pig spermatozoa. *Arch. Androl.* 1991;26:93-105.
33
34 Gatewood J.M., Cook G.R., Balhorn R., Bradbury E.M. y Schmid C.W. Sequence specific packaging
35 of DNA in human sperm chromatin. *Science* 1987; 236:962-964.
36
37 Gaunt S.J., Brown C.R., Jones R. Identification of mobile and fixed antigens on the plasma
38 membrane of rat spermatozoa using monoclonal antibodies. *Exp. Cell Res.* 1983;144:275-284.
39
40 Getsenberg R.H., Pienta K.J. y Coffey D.S. The tissue matrix: cell dynamics and hormone action.
41 *Endocrin. Rev.*1990;11:399-417.
42
43 Gopalkrishnan K, Hinduja IN, Anand Kumar TC. (1991). In vitro decondensation of nuclear
44 chromatin of human spermatozoa: assessing fertilizing potential. *Arch Androl* 27:43-50.
45
46 Gordon M., Dandekar P.V., Eager P.R. Identification of phosphatases on the membranes of guinea
47 pig sperm. *Anat. Rec.* 1978;191:123.
48
49 Haidl G, Schill WB. (1994). Assessment of sperm chromatin decondensation: An important test
50 for prediction of IVF outcome. *Arch Androl* 32: 263-266.
51
52 Han T.L., Ford J.H., Webb G.C., Flaherty S.P., Correll A., Matthews C.D. Simultaneous detection of
53 X-and Y-bearing human sperm by double fluorescence in situ hybridization. *Mol. Reprod. Dev.*
54 1993;34:308-313.
55

- 1 Hecht N.B. Mammalian protamines and their expression. In: Hnilica L.S., Stern G.S., Stern J.L. eds.
2 Histones and Other Basic Proteins. Boca Raton, Florida: CRC Press; 1989:347-372.
3
- 4 Hernández-Pérez O. y Rosado A. Biología molecular del espermatozoide humano. Ciencia
5 1988;39:249-260.
6
- 7 Herr J.C., Eddy E.M. Identification of mouse sperm surface antigens by a surface labeling and
8 immunoprecipitation approach. Biol. Reprod. 1980;22:1263-1274.
9
- 10 Hicks J.J., Pedrón N., Rosado A. Modifications of human spermatozoa glycolysis by cyclic adenosine
11 monophosphatase (cAMP), estrogens and follicular fluid. Fertil. Steril. 1972;23:886-893.
12
- 13 Hort WV, North RD. Termotrophic phase transition in the plasma membrane of spermatozoa. J
14 Reprod Fertil 1986;78:447-457
15
- 16 Huacuja L., Delgado N.M., Merchant H., Pancardo R.M., Rosado A. Cyclic AMP induced
17 incorporation of ^{33}P into human sperm membrane components. Biol. Reprod. 1977;17:89-96.
18
- 19 Huret JL, Courtot AM. (1984). Effect of migration and capacitation on the nuclear stability of
20 human sperm. Arch Androl 13:147-152.
21
- 22 Huret JL. (1983). Variability of the chromatin decondensation ability test on human sperm. Arch
23 Androl 11:1-7.
24
- 25 Itoh T., Ohsumi K., Katagiri C. Remodeling of human sperm chromatin mediated by nucleoplasmin
26 from amphibian eggs. Dev. Growth Diff. 1993;35:59-66.
27
- 28 Jager, S., Wijchman J., Kremer J. Studies on the decondensation of human, mouse, and bull sperm
29 nuclei by heparin and other polyanions. J. Exp. Zool. 1990;256:315-322.
30
- 31 Johnson, R.T., Rao P.N., Hughes S. Mammalian cell fusion III. A hela cell inducer of premature
32 chromosome condensation active in cells from a variety of animal species. J. Cell Physiol.
33 1970;76:151-157.
34
- 35 Katz D.F., Drobnis E.Z., Overstreet J.W. Factors regulating mammalian sperm migration through the
36 female reproductive tract and oocyte vestments. Gamete Res. 1989;22:443-469.
37
- 38 Koehler J.K. A freeze-etch study of rabbit spermatozoa with particular reference to head structures. J.
39 Ultrastruct Res. 1970;33:598-614.
40
- 41 Koehler J.K. Studies on the distributio of antigenic sites on the surface of rabbit spermatozoa. J. Cell
42 Biol. 1974;67:647-659.
43
- 44 Koo G.C., Stackpole C.W., Boyse E.A., Hammerling U., Lardis M.P. Topographical location of H-Y
45 antigen on mouse spermatozoa by immunoelectronmicroscopy. Proc. Natl. Acad Sci. USA
46 1973;70:1502-1505.
47
- 48 Kretser D.M., Kerr J.B. The cytology of the testis. En: The physiology of Reproduction, 2nd edition.
49 Eds. Knobil E., Newill J.D. Raven Press Ltd. New York. 1994. 1er volumen Capitulo 21.
50
- 51 Kvist U. (1980). Sperm nuclear chromatin decondensation ability. Acta Physiol Scand. Suppl.
52 486.
53
- 54 Langlais J., Zollinger M., Plante L., Chapdelaine A., Bleau G., Roberts K.D. Localization of
55 cholesteryl sulfate in human spermatozoa in support of a hypothesis for the mechanism of
56 capacitation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1981;78:7266-7270.

1
2 Leeton J., Healy D., Rogers P., Yates C., Caro C. A controlled study between the use of gamete
3 intrafallopian tube transfer (GIFT) and in vitro fertilization and embryo transfer in the management of
4 idiopathic and male infertility. *Fertil. Steril.* 1987;48:605-607.

5
6 Longo F.J., Cook S. Formation of perinuclear theca in spermatozoa of diverse mammalian species.
7 Relationships of the manchette and multiple band polypeptides. *Mol. Reprod. Dev.* 1991;28:380-393.

8
9 López L.C., Bayna E.M., Litoff D., Shaper N.L., Shaper J.H., Shur B.D. Receptor function of mouse
10 sperm surface galactosyltransferase during fertilization. *J. Cell Biol.* 1985;101:1501-1510.

11
12 López M.L., de Souza W., Bustos-Obregon E. Cytochemical analysis of the anionic sites on the
13 membrane of the stallion spermatozoa during the epididymal transit. *Gamete Res.* 1987;18:319-332.

14
15 Mahi CA, Yanagimachi R. The effect of temperature, osmolarity and hydrogen ion concentration on
16 the activation and acrosome reaction of golden hamster spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 1973;35:55-56

17
18 Martin RH, Rademaker A. (1987). The relationship between sperm chromosomal abnormalities
19 and sperm morphology in humans. *Mutation Res.* 207:159-164.

20
21 Marushige Y, Marushige K. (1974). Properties of chromatin isolated from bull spermatozoa.
22 *Biochim Biophys Acta.* 340:498-508.

23
24 McGhee J.D. y Felsenfeld F. Nucleosome structure. *Ann Rev. Biochem.* 1980;49:1115-1156.

25
26 Meizel S. Molecules that initiate or help stimulate the acrosome reaction by their interaction with the
27 mammalian sperm surface. *Am. J. Anat.* 1985;174:285-30.

28
29 Meizel S. The mammalian sperm acrosome reaction. A biochemical approach. En: *Development in*
30 *Mammals*, editado por Johnson M.H. New York, North Holland. 1978;3:1-64.

31
32 Mendoza C., Tesarik J.: Effect of follicular fluid on sperm movement characteristics. *Fertil. Steril.*
33 1990;54:1135-1139.

34
35 Menezo Y. (1976). Milieu synthétique pour la survie et la maturation des gamètes et pour la
36 culture de l'oeuf fécondé. *CR Acad Sci* 282:1967-1979.

37
38 Mercado E. y Rosado A. Moléculas de adhesión celular. *Ciencia.* (México) En prensa.

39
40 Morales, P., Overstreet J.W., Katz, D.F. Changes in human sperm motion during capacitation in
41 vitro. *J. Reprod. Fertil.* 1988;83:119-128.

42
43 Myles DG, Primacoff P. Sperm surface domains. In: Springer DA, ed. "Hybridoma Technology in the
44 biosciences and medicine". New York: Plenum Press, 1985:239-250

45
46 Nicolle JC, Fournier-Delpech S, Courot M. (1985). Influence of uterine secretions on the
47 chromatin of ram spermatozoa at different stages of maturation. Cytophotometric study of
48 Feulgen-DNA after in vitro incubation. *Gamete Res.* 11:321-328.

49
50 Nikolopoulou M., Soucek D.A., Vary J.C. Changes in the lipid content of boar sperm plasma
51 membranes during epididymal maturation. *Biochim. Biophys. Acta* 1985;815:486-498.

52
53 Noyes R.W. Fertilizing capacity of spermatozoa. *Western J. Surg. Obstet. Gynecol.* 1953;61:342-
54 349.

55

- 1 O'Rand M.G., Romrell L.J. Appearance of regional surface autoantigens during spermatogenesis:
2 Comparison of anti-testis and anti-sperm antisera. *Dev. Biol.* 1980;75:431-441.
- 3
4 O'Rand M.J. The presence of sperm-specific isoantigens on the egg following fertilization. *J. Exp.*
5 *Zool.* 1977;202:267-273.
- 6
7 Ohsumi K., Katagiri C., Yanagimachi R. Development of pronuclei from human spermatozoa
8 injected microsurgically into frog (*Xenopus*) eggs. *J. Exp. Zool.* 1986;237:319-325.
- 9
10 Okabe M., Adachi T., Takada K., Oda H., Yagasaki M., Kohama Y., Mimura T. Capacitation related
11 changes in antigen distribution on mouse sperm heads and its relation to fertilization rate in vitro. *J.*
12 *Reprod. Immunol.* 1987;11-91.
- 13
14 Oko R., Clermont Y. Origin and distribution of perforatorial proteins during spermatogenesis of the
15 rat. An immunocytochemical study. *Anat. Rec.* 1991;230:489-501.
- 16
17 Olson G.E., Winfrey V.P. Characterization of postacrosomal sheath of bovine spermatozoa. *Gamete*
18 *Res.* 1988;20:329-342.
- 19
20 Orgebin-Crist M.C., Fournier-Delpech S. Sperm-egg interaction: evidence for maturational changes
21 during epididymal transit. *J. Androl* 1982;3:429-433.
- 22
23 Overstreet J.W. Transport of gametes in the reproductive tract of the female mammal. In: Hartmann
24 J.F. ed. *Mechanism Controlling Animal Fertilization*. New York: Academic Press. 1983;499-543.
- 25
26 Pardoll D.M., Vogelstein B. y Coffey D.S. A fixed site of DNA replication in eucaryotic cells. *Cell*
27 1980;19:527-536.
- 28
29 Parks J.E., Arion J.W., Foote R.H. Lipids of plasma membrane and outer acrosomal membrane from
30 bovine spermatozoa. *Biol. Reprod.* 1987;37:1249-1258.
- 31
32 Parks J.E., Hammerstedt R.H. Developmental changes occurring in the lipids of ram epididymal
33 spermatozoa plasma membrane. *Biol. Reprod.* 1985;32:653-668.
- 34
35 Perreault S.D., Barbee R.R. Sperm nucleus decondensation depends on glutathione synthesis in
36 maturing hamster oocytes. *Dev. Growth Diff.* 1986;28(Suppl):53(abst.7).
- 37
38 Perreault SD, Wolff RA, Zirkin BR. (1987). The timing of hamster sperm nuclear
39 decondensation and male pronucleus formation is related to sperm nuclear disulfide bond
40 contents. *Biol Reprod* 36:239-244.
- 41
42 Phillips D.M. Surface of the equatorial segment of mammalian acrosome. *Biol. Reprod.*
43 1977;16:128-137.
- 44
45 Philpott A., Leno G.H. Nucleoplasmin remodels sperm chromatin in *Xenopus* egg extracts. *Cell*
46 1992;69:759-767.
- 47
48 Pienta K.J. y Coffey D.S. A structural analysis of the role of the nuclear matrix and DNA loops in the
49 nucleus and chromosomes. *J. Cell Sci. Suppl.* 1984;1:123-135.
- 50
51 Poccia D. (1986). Remodeling of nucleoproteins during gametogenesis, fertilization and early
52 development. *Int Rev Cytol*, 105:1-65.
- 53
54 Poccia D. Remodeling of nucleoproteins during gametogenesis, fertilization and early development.
55 *Int. Rev. Cytol.* 1986;105:1-65.
- 56

- 1 Pogany G.C., Balhom R. Quantitative fluorometry of abnormal mouse sperm nuclei. *J. Reprod.*
2 *Fertil.* 1992;96:25-34.
3
- 4 Pogany G.C., Corzen M., Weston S. y Balhom R. DNA and protein content of mouse sperm.
5 Implications regarding sperm chromatin structure. *Exp. Cell Res.* 1981;136:127-136.
6
- 7 Porcelli F, Lange Consiglio A, Cremonesi F, Ferrandi B. (1987). Cytochemical study of mouse
8 spermatozoa chromatin during epididymal maturation and during in vitro and in vivo
9 capacitation. *Arch Vet Ital* 38:33-39.
- 10
- 11 Primakoff P., Myles D.G. A map of the guinea pig sperm surface constructed with monoclonal
12 antibodies. *Dev. Biol.* 1983;98:417-428.
13
- 14 Reyes A. Tesis doctoral: Bioquímica de la capacitación-Reacción Acrosomal en el espermatozoide
15 de mamífero. Universidad Autónoma de Tlaxcala, 1994.
16
- 17 Reyes A., Chavarria M.E., Rosado A. Interference with spermatozoa capacitation. En: *Regulation of*
18 *Male Fertility*, editado por Cunningham G.R., Schill W.B., Hafez E.S.E. The Hague, Martinus Nijhoff
19 Pub. 1980:135-149.
- 20
- 21 Reyes A., Delgado N.M., Chavarria M.E., Rosado A. Algunos conceptos nuevos sobre el mecanismo
22 terminal de la fertilización en los mamíferos. *Ginec. Obstet. Méx.* 1990;58:292-299.
23
- 24 Reyes A., Goicoechea B., Rosado A. Calcium requirement for rabbit spermatozoal capacitation and
25 enhancement of fertilizing ability by ionophore A23187 and cyclic adenosine 3':5'monophosphate.
26 *Fertil. Steril* 1978;29:451-455.
27
- 28 Reyes A., Luna M., Chavarria M.E. Determinación de actividad de adenilil ciclase en el acrosoma
29 del espermatozoide de cobayo. *Arch. Invest. Méd. (Méx.)* 1988;19:265-274.
30
- 31 Reyes A., Oliphant G., Brackett B.G. Partial purification and identification of a reversible
32 decapacitation factor from rabbit seminal plasma. *Fertil. Steril.* 1975;26:148-157.
33
- 34 Reyes R, Rosado A, Hernández O, Delgado NM. (1989). Heparin and glutathione: Physiological
35 decondensing agents of human sperm nuclei. *Gamete Res.* 23:39-47.
36
- 37 Reyes R., Rosado A., Hernández O., Delgado N.M. Heparin and glutathion: physiological
38 decondensing agents of human sperm nuclei. *Gamete Res.* 1989;23:39-47.
39
- 40 Robertson L., Wolf D.P., Tash J.S. Temporal changes in motility parameters related to acrosomal
41 status: Identification and characterization of populations of hyperactivated human sperm. *Biol. Reprod.*
42 1988;39:797-805.
43
- 44 Rodríguez H, Ohanian C, Bustos-Obregón E. (1985). Nuclear chromatin decondensation of
45 spermatozoa in vitro: a method for evaluating the fertilizing ability of ovine semen. *Internl J*
46 *Androl* 8:147-158.
47
- 48 Rogers B.J. Mammalian sperm capacitation and fertilization in vitro: A critique of methodology.
49 *Gamete Res.* 1978;1:165-223.
50
- 51 Rogers B.J., Perreault S.D. Importance of glycolysable substrates for in vitro capacitation of human
52 spermatozoa. *Biol. Reprod.* 1990;43:1064-1069.
53
- 54 Rosado A. Aspectos nuevos de viejas ideas sobre la capacitación y la reacción acrosomal. *Arch.*
55 *Invest. Med. (Méx.)* 1988;19:253-264.
56

1 Rosado A., Velazquez A., Lara-Ricalde R. Cell polarography. II. Effect of neuraminidase and
2 follicular fluid upon the surface characteristics of human spermatozoa. *Fertil Steril.* 1973;24:349-354.

3
4 Royere D, Hammar S, Nicolle JC, Lansac J. (1991). Does in vitro capacitation alter chromatin
5 stability of ejaculated human spermatozoa? *Cytochemical studies. Mol Reprod Develop* 28:177-
6 182.

7
8 Saling P.M., Bedford J.M. Absence of species specificity for mammalian sperm capacitation in vivo.
9 *J. Reprod. Fertil.* 1981;63:119-123.

10
11 Saxena N.K., Russell L.D., Saxena N., Peterson R.N. Immunofluorescence antigen localization on
12 boar sperm plasma membrane: Monoclonal antibodies reveal apparent new domains and apparent
13 redistribution of surface antigens during sperm maturation and at ejaculation. *Anat. Rec.*
14 1986;214:238-252.

15
16 Schubeus P, Zenzes MT, Schuhmann B, Freund I. (1986). Time course of human sperm
17 transformation in the cytoplasm of zona-free hamster ova. *Human Reprod.* 1:529-532.

18
19 Seligman J., Shalgi R., Oschry Y., Kosower N.S. Sperm analysis by flow cytometry using the
20 fluorescent thiol labeling agent monobromobimane. *Mol. Reprod. Dev.* 1991;29:276-281.

21
22 Sharon N., Lis H. Use of lectins for the study of membranes. In: Kom E.D. ed. *Methods in membrane*
23 *biology*, vol. 3 New York: Academic Press; 1974:147-199.

24
25 Smith T.T., Yanagimachi R. Capacitation status of hamster spermatozoa in the oviduct at various
26 times after mating. *J. Reprod. Fert.* 1989;86:255-261.

27
28 Stief A., Winter D.M., Stratling W.H. y Sippel A. A nuclear DNA attachment element mediates
29 elevated and position independent gene activation. *Nature* 1989;341:343-345.

30
31 Stryer L. *Biochemistry*, 3rd ed. New York: W.H. Freeman, 1988:283.

32
33 Tumpaichitr N., Sobhon P., Taluppeth N. y Chalermisarachai P. Basic nuclear proteins in testicular
34 cells and ejaculated spermatozoa in man. *Exp. Cell Res.* 1978;117:347-356.

35
36 Tesarik J., Mendoza C., Testart J. Effect of the human cumulus oophorus on movement
37 characteristics of human capacitated spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 1990;88:665-675.

38
39 Thibault C., Dauzier L., Wintenberger S. Etude cytologique de la fecondation in vitro de l'oeuf de la
40 lapin. *C. R. Soc. Sci. Biol.* 1954;148:789.

41
42 Toshimori K., Higashi R., Oura C., Filipin-sterol complexes in golden hamster sperm membranes
43 with special reference to epididymal maturation. *Cell Tissue Res.* 1987;250:673-680.

44
45 Toyoda Y, Naito K. IVF in domestic animals. In: Bavister BD, et al, Eds. "Fertilization in mammals"
46 Norwell, Massachusetts: Serono Symposia, USA: 1990: 335-347

47
48 Tung K.S.K., Han L-B.P., Evan A.P. Differentiation autoantigen of testicular cells and spermatozoa in
49 the guinea pig. *Dev. Biol.* 1979;68:224-238.

50
51 Usui N., Yanagimachi R. Behavior of hamster sperm nuclei incorporated into eggs at various stages
52 of maturation, fertilization and early development. *J. Ultrastruc Res.* 1976;57:276-288.

53
54 Vaughn J.P., Dijkwel P.A., Mulender L.H.F. y Hamlin J.L. Replication forks are associated with the
55 nuclear matrix. *Nucleic Acids Res.* 1990;18:1965-1969.

56

- 1 Velázquez A., Reyes A., Chargoy J., Rosado A. Amino acid and protein concentrations of human
2 follicular fluid. *Fertil. Steril.* 1977;28:96-100.
- 3
- 4 Villarroya S., Scholler R. Lateral diffusion of a human sperm-head antigen during incubation in a
5 capacitating medium and induction of the acrosome reaction in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 1987;80:545.
- 6
- 7 Villarroya S., Scholler R. Regional heterogeneity of human spermatozoa detected with monoclonal
8 antibodies. *J. Reprod. Fertil.* 1986;76:435-447.
- 9
- 10 Vogl A.W. y Soucy L.J. Arrangement and possible function of actin filament bundles in ectoplasmic
11 specializations of ground squirrel Sertoli cells. *J. Cell Biol.* 1985;100:814-825.
- 12
- 13 Ward W.S. y Coffey D.S. Identification of a sperm nuclear annulus: a DNA anchor. *Biol. Reprod.*
14 1989;41:361-370.
- 15
- 16 Ward W.S., Partin A.W. y Coffey D.S. DNA loop domains in mammalian spermatozoa.
17 *Chromosoma* 1989;98:153-159.
- 18
- 19 Weiman S., Ores-Carton F., Rainteau D., Puszkun S. Immunoelectron microscopic localization of
20 calmodulin and phospholipase A2 in spermatozoa. *J. Histochem. Cytochem.* 1986;34:1171-1179.
- 21
- 22 Welch J.E. y O'Rand M.G. Identification and distribution of actin in spermatogenic cells and
23 spermatozoa of the rabbit. *Dev. Biol.* 1985;109:411-417.
- 24
- 25 White D.R., Aitken J.R. Relationship between calcium, cyclic AMP, ATP, and intracellular pH and the
26 capacity of hamster spermatozoa to express hyperactivated motility. *Biol. Reprod.* 1989
- 27
- 28 Windt M.L., Debeer P.M., Franken D.R., Rhemrev J., Menkveld R., Lombard C.J., Kruger T.F. (1994).
29 Sperm decondensation and semen parameters. Utilization of a simple staining technique for the
30 evaluation of human sperm decondensation. *Andrologia* 26:67-72.
- 31
- 32 Wolf D.E., Lipscomb A.C., Maynard V.M. Causes of nondiffusing lipid in the plasma membrane of
33 mammalian spermatozoa. *Biochemistry* 1988;27:860-865.
- 34
- 35 Wolf D.E., Maynard V.M., McKinnon C.A., Melchior D.L. Lipid domains in the ram sperm plasma
36 membrane demonstrated by differential scanning calorimetry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*
37 1990;87:6893-6896.
- 38
- 39 World Health Organization Special Programme Of Research Development And Research
40 Training In Human Reproduction (1987). Manual for the examination of human semen and
41 semen cervical mucus interaction. Cambridge University Press. Cambridge
- 42
- 43 Wyrobek A.J., Meistrich M.L., Furrer R. y Bruce W.R. Physical characteristics of mouse sperm
44 nuclei. *Biophys. J.* 1976;16:811-825.
- 45
- 46 Yanagimachi R., Katayose H., Matsuda J., Yanagida K. (1992). Stability of mammalian sperm
47 nuclei. In: *Molecular and cellular biology of reproduction*. Eds. G. Spera, A. Fabbrini, L. Gnessi
48 and C.W. Bardin. Raven Press, New York. pp. 157-168.
- 49
- 50 Yanagimachi R. Capacitation and the acrosome reaction. En: *Gamete Physiology*, editado por Asch
51 R.H., Balmaceda J.P., Johnson I. Sero Symposium, USA 1990;31-42.
- 52
- 53 Yanagimachi R. Mammalian fertilization. En: *The physiology of Reproduction*. 2nd edition. Eds.
54 Knobil E., Neill J.D., Raven Press Ltd. New York. 1994. 1er volumen.
- 55
- 56