

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Casa abierta al tiempo

XOCHIMILCO



Casa abierta al tiempo

**EFFECTO DE LOS INHIBIDORES DE H⁺-ATPasas DURANTE LA
MADURACIÓN, CAPACITACIÓN Y REACCIÓN ACROSOMAL
DEL ESPERMATOZOIDE DE CONEJO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA

M. en C. REBECA GARCÍA MACEDO

MÉXICO, D. F.

2000

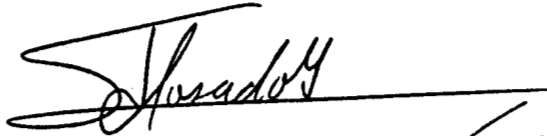
El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93.

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presenté

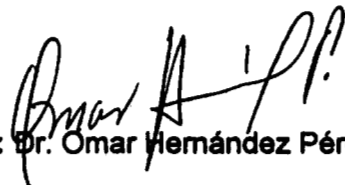
M. en C. Rebeca García Macedo

El día 4 de septiembre del 2000

Comité Tutorial



Tutor: Dr. Adolfo Rosado García ✓ 4457



Asesor 1: Dr. Omar Hernández Pérez



Asesor 2: Dr. Efraín Mercado Pichardo



Sinodal 1: Dr. José Miguel Betancourt Rule



Sinodal 2: Dr. Luis Arturo Baiza Gutman

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTOR DE TESIS

DR. ADOLFO ROSADO GARCÍA

**PROFESOR TITULAR "C" e INVESTIGADOR DISTINGUIDO
DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
INVESTIGADOR EMÉRITO EN EL
SISTEMA NACIONAL DE INVESTIGADORES**

ASESOR

DR. OMAR HERNÁNDEZ PÉREZ

**INVESTIGADOR TITULAR DEL INSTITUTO MEXICANO
DEL SEGURO SOCIAL**

ASESOR

DR. EFRAÍN MERCADO PICHARDO

**PROFESOR TITULAR "C" DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA**

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MEDICA EN BIOQUÍMICA, DEL HOSPITAL DE ESPECIALIDADES, CENTRO MÉDICO SIGLO XXI DEL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.

ESTE PROYECTO CONTÓ CON EL FINANCIAMIENTO POR PARTE DEL CONACYT CON EL NÚMERO: 0699 P-M9506.

**DEDICO LA PRESENTE TESIS A TODAS AQUELLAS PERSONAS
QUE ME HAN ACOMPAÑADO EN ESTE MARAVILLOSO CAMINO
DEL CONOCIMIENTO CIENTÍFICO Y A QUIENES ME BRINDARON
SU APOYO, CONFIANZA Y SABIDURÍA.**

GRACIAS

REBECA GARCÍA MACEDO

EFFECTO DE LOS INHIBIDORES DE H⁺-ATPasas DURANTE LA MADURACIÓN, CAPACITACIÓN Y REACCIÓN ACROSOMAL DEL ESPERMATOZOIDE DE CONEJO

M. en C. REBECA GARCÍA MACEDO

RESUMEN.

Los espermatozoides de mamíferos mantienen los gradientes iónicos regulados con precisión durante los procesos de capacitación y reacción acrosomal. En otros tipos de células, dichos gradientes se modulan principalmente por medio de tres tipos de ATPasas, que presentan diferencias metabólicas y que se localizan en la membrana plasmática. En el presente trabajo estudiamos las modificaciones en la capacitación *in vitro* de los espermatozoides de conejo, inducidas por la inhibición específica de las H⁺-ATPasas tipo V con el antibiótico macrólido bafilomicina A1.

Usamos el método de clorotetraciclina para monitorear la capacitación, y el método de tinción con azul de Coomassie para identificar los espermatozoides con reacción acrosomal. Hubo diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides capacitados *in vitro* que provenían del epidídimo (66±7) y eyaculados (43±11), después de su incubación durante 6 horas en presencia de Ca²⁺ y en ausencia del inhibidor de ATPasas. La presencia de bafilomicina A1 redujo significativamente esos valores (25±11 y 16±8 %, en espermatozoides del epidídimo y eyaculados, respectivamente) y eliminó la diferencia anteriormente observada. En los espermatozoides eyaculados capacitados en ausencia de bafilomicina, el porcentaje de reacción acrosomal, inducida con el ionóforo de calcio A23187, fue lineal (12±5, 23±6, 31±5, a los 15, 30 y 45 minutos). La presencia de bafilomicina A1 (0.2

$\mu\text{moles.l}^{-1}$) durante la capacitación provocó una disminución significativa en los porcentajes de reacción acrosomal (4 ± 2 , 8 ± 3 , 14 ± 4 , a los 15, 30 y 45 minutos.). La adición de bafilomicina A1 después del periodo de capacitación no tuvo efecto en la reacción acrosomal inducida con A23187. En los espermatozoides capacitados en ausencia de bafilomicina A1 se observó un incremento en el pH intracelular (pHi) de 0.23 unidades comparado con el pHi de los no capacitados, la adición de bafilomicina A1 durante el periodo de capacitación evitó dicho incremento, no se presentó el efecto cuando el inhibidor se adicionó al final de la capacitación. Los resultados del presente trabajo indican que las H^+ ATPasas tipo V juegan un papel importante durante la capacitación de los espermatozoides de conejo, una vez que los espermatozoides se han capacitado, este tipo de ATPasas no tienen una participación significativa en la inducción de la reacción acrosomal.

EFFECT OF THE H⁺-ATPases INHIBITORS DURING THE MATURATION,
CAPACITATION AND ACROSOME REACTION OF THE RABBIT SPERMATOZOA.

M. en C. REBECA GARCÍA MACEDO

Summary.

Mammalian spermatozoa maintain precisely regulated ionic gradients that must be modified during capacitation and the acrosomal reaction. In other cell types, ionic gradients are mainly regulated by the presence in plasma membranes of three metabolically different types of ATPases. The modifications induced during *in vitro* capacitation of rabbit spermatozoa by the specific inhibition of V-type H⁺-ATPases with bafilomycin A1 were studied. We used chlortetracycline binding to rabbit spermatozoa to monitor capacitation, and the coomassie brilliant blue method to identify acrosome-reacted sperm cells. There was a significant difference between the percentage of epididymal (66±7%) and of ejaculated (43±11%) spermatozoa capacitated *in vitro*, after a 6 h incubation period in the presence of Ca²⁺ without ATPase inhibitor. Presence of bafilomycin significantly reduced these numbers (25±11% and 16±8%, epididymal and ejaculated spermatozoa, respectively) and eliminated the difference. Ejaculated spermatozoa capacitated in the absence of bafilomycin showed a linear increase in the percentage of acrosomal reactions

induced by addition of A23187 (12 ± 5 ; 23 ± 6 , 31 ± 6 ; after 15, 30 and 45 min). Presence of $0.2 \mu\text{mol l}^{-1}$ bafilomycin during the capacitation incubation induced a significant decrease in the acrosome reaction percentages (4 ± 2 , 8 ± 3 , 14 ± 4 ; after 15, 30 and 45 min). Addition of bafilomycin after the capacitating period had no effect upon the induction of the acrosomal reaction by A23187. Capacitated spermatozoa in absence of bafilomycin showed an increase in intracellular pH (pHi) about 0.23 units, addition of bafilomycin during the capacitating period abolished the increased pHi, but when V-ATPase inhibitor was added after the capacitating period had no effect. These results indicate that vacuolar H^+ -ATPases play an important role during rabbit sperm capacitation; however, once the sperm has been capacitated V-Type H^+ -ATPases do not have a significant participation during the acrosomal reaction.

ÍNDICE

I. Introducción	
1. Aspectos generales de la maduración epididimaria	1
1.1 Cambios morfológicos	2
1.2 Cambios en la composición macromolecular de la membrana plasmática	3
1.3 Fluidez de la membrana	3
1.4 Modificaciones en el contenido de lípidos	4
1.5 Modificaciones en la movilidad espermática	4
2. Fertilización	8
3. Capacitación	8
3.1 Cambios en el espermatozoide durante la capacitación	9
4. Reacción acrosomal	12
5. Transporte de iones	18
6. Regulación de las concentraciones de iones en el interior de los espermatozoides	22
II Hipótesis	28
III. Objetivos generales	28
IV. Objetivos particulares	29
V. Material y Métodos	30
VI. Resultados	40
VII. Discusión	56
VIII. Conclusiones	62
IX. Bibliografía	63
X. Difusión de los resultados	73

I. INTRODUCCION.

1.- ASPECTOS GENERALES DE LA MADURACIÓN EPIDIDIMARIA.

Una vez que la espermatogénesis finaliza, los espermatozoides son transportados de los túbulos seminíferos de los testículos, hacia el epidídimo (cabeza, cuerpo y cola), lugar donde los espermatozoides de todas las especies de mamíferos, hasta ahora estudiadas, sufren un proceso de maduración cambiando su patrón de movilidad y adquiriendo la capacidad para reconocer y fertilizar al ovocito.

Los cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos que se han identificado en los espermatozoides mientras estos transitan por el epidídimo se conocen como **maduración epididimaria** (Bellvé y col., 1993; Eddy y O'Brien, 1994).

Las células epiteliales de diferentes segmentos del epitelio del epidídimo secretan glicerofosforilcolina, ácido siálico, proteínas específicas y compuestos de bajo peso molecular. Este microambiente también está influenciado por la composición bioquímica testicular, los espermatozoides y las hormonas (debido al suministro de andrógenos por la circulación sistémica y por el fluido de la red testicular). El tránsito de los espermatozoides por el epidídimo es de aproximadamente dos semanas, pero la duración exacta depende de la especie (Hoskins y Vijayaraghavan 1990).

1.1.- Cambios morfológicos.

Durante la maduración epididimaria la gota citoplasmática, que inicialmente se encuentra en la base de la cabeza, migra hacia la pieza media y el flagelo. Se modifican algunos componentes citoestructurales del acrosoma, el núcleo y el flagelo (Hernández-Pérez y Rosado, 1988). En los espermatozoides de algunas especies tales como: cobayos, conejos, monos y cerdos, se han reportado alteraciones en la morfología del acrosoma y modificaciones en el complejo ADN-proteínas en el núcleo (Crabo y Hunter, 1974).

Las proteínas del núcleo de los espermatozoides y de la cubierta perinuclear se modifican durante este proceso, por ejemplo, las proteínas nucleares de los espermatozoides de rata, que incluyen a las protaminas, forman puentes disulfuro intra e intermoleculares. Estas uniones covalentes dan estabilidad y modelan la cromatina del espermatozoide (Bellvé y col., 1993). En general la estructura de los espermatozoides se estabiliza, por la oxidación progresiva de los grupos SH, los espermatozoides de la cabeza del epidídimo de conejo presentan mayor cantidad de grupos SH que los de la cola (Reyes y col., 1976).

Los cambios morfológicos durante la maduración epididimaria se concentran en la membrana plasmática y son consecuencia de las alteraciones en las moléculas que la forman.

1.2.- Cambios en la composición macromolecular de la membrana plasmática.

Estudios con anticuerpos fluorescentes contra antígenos del plasma seminal de conejos y cerdos, han demostrado que las proteínas de la membrana plasmática se modifican durante la maduración epididimaria, probablemente por la propiedad de la membrana plasmática de adsorber una variedad de sustancias del medio ambiente.

En las especies animales como rata, ratón y cobayo, se ha observado que en los espermatozoides de diferentes regiones del epidídimo cambian en los patrones de distribución de ciertas partículas intra-membranales (PIMs) (Suzuki, 1990; Yanagimachi, 1994).

Las glicoproteínas se distribuyen en diferentes dominios sobre la superficie de la membrana plasmática de los espermatozoides, se ha observado en diferentes especies animales como rata, ratón, cobayo, toro y conejo (Eccleston y col., 1994; Yanagimachi, 1994).

Por medio de técnicas electroforéticas se ha demostrado que la carga de la superficie del espermatozoide cambia durante este proceso. Los espermatozoides de la cola del epidídimo presentan una carga neta negativa mayor que la de los espermatozoides de la cabeza en diferentes especies animales (Bedford, 1963; Bedford y col., 1973; Moore, 1979), las modificaciones en el contenido de ácido siálico, glicoproteínas y carbohidratos pueden ser el origen de estas diferencias.

1.3.- Fluidez de la membrana.

Durante la maduración espermática, se ha observado un incremento en la relación

molar colesterol/fosfolípidos en algunas regiones de la membrana, que provoca una disminución en la fluidez de la membrana, la cual podría modificar la adquisición de la movilidad progresiva del espermatozoide y su capacidad fertilizante (Mercado y col., 1992).

1.4.- Modificaciones en el contenido de lípidos.

Por otro lado el contenido de lípidos, entre los que se incluyen: fosfatidilserina; fosfatidiletanolamina; plasmalógeno y ácidos grasos insaturados, disminuye durante la maduración epididimaria, sin embargo la relación molar entre colesterol y fosfolípidos se incrementa en las membranas plasmáticas periacrosomales, aisladas de los espermatozoides de hamster, cerdo, toro carnero, cobayo y rata (Huacuja y col., 1981; Yanagimachi, 1994). Esta relación puede determinar la estabilidad y permeabilidad de la membrana, así como inhibir la reacción acrosomal prematura (Suzuki, 1990).

1.5.- Modificaciones en la movilidad espermática.

Otro aspecto importante de la maduración epididimaria, es que la movilidad de los espermatozoides está regulada por la presencia de Ca^{2+} , compuestos asociados a este ión como adenosina y adenosín monofosfato cíclico (AMPc) (Kann y Serres, 1980), por cambios en el pH intracelular (pHi) y por proteínas asociadas a la membrana (calmodulina, proteína cinasa A) (Pariset y col., 1985).

Los espermatozoides de las diferentes regiones del epidídimo presentan distintas

concentraciones de Ca^{2+} endógeno. En los espermatozoides de la cabeza del epidídimo la concentración es $> 600 \text{ ng ml}^{-1}$, que es 2-3 veces mayor que en los espermatozoides de la cola del epidídimo. Estas diferencias se deben, en parte, a en la cabeza del epidídimo los espermatozoides incorporan mayor cantidad de Ca^{2+} que los de la cola (Hoskins y Vijayaraghavan, 1990).

Los espermatozoides de la cabeza del epidídimo presentan escasa ó nula movilidad y en la cola epididimaria su movimiento se hace más vigoroso, así mismo el movimiento flagelar se vuelve ondulatorio. La actividad de la dineína adenosín trifosfatasa (dineína-ATPasa), enzima asociada al aparato motor del espermatozoide, puede modificarse durante la maduración epididimaria y participar en el control la movilidad (Yanagimachi, 1994). Si se tienen concentraciones endógenas de Ca^{2+} arriba de la milimolaridad, la movilidad se inhibe (Hoskin y Vijayaraghavan, 1990). La concentración de calcio intracelular, en el espermatozoide, está regulada por las actividades de la bomba de Ca^{2+} y del sistema anti-puerto $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$, localizadas en la membrana plasmática.

La fosforilación de proteínas dependientes de AMPc y el mismo nucleótido cíclico participan de manera sinérgica en el inicio y regulación de la movilidad espermática (Hoskins y Vijayaraghavan, 1990).

Los espermatozoides de bovino durante su paso por el epidídimo presentan una alcalinización intracelular, con cambios de pH de 5.8 a 6.3. En otras especies se han observado incrementos de 0.3 a 0.4 unidades. En general, estos pequeños aumentos en la alcalinidad del citoplasma de las células, incluyendo al espermatozoide, se

consideran como parte de los procesos de activación celular (Majunder y col., 1990). Por otro lado las células epiteliales de la cola del epidídimo de hamster, secretan una proteína denominada C5; esta proteína provoca que los espermatozoides poco móviles, que llegan a dicha región, adquieran la movilidad progresiva (Moore y col., 1985). De manera similar las proteínas D y E en el epidídimo de la rata, modifican el patrón de movilidad de los espermatozoides (Pholpramool y col., 1983). En los espermatozoides de perro, se ha identificado una proteína que se requiere para iniciar su movilidad, ésta es fosforilada por una proteína cinasa dependiente de AMPc (Hoskins y Vijayaghavan, 1990).

Otro mecanismo que puede participar en la adquisición de la movilidad se lleva a cabo a través de los efectos producidos por las proteínas denominadas factores descapacitantes ó inhibidores de la movilidad espermática. Los espermatozoides en contacto con el plasma seminal se asocian con estos factores descapacitantes, los cuales se han descrito en distintas especies: conejo (Eng y Oliphant, 1978), humano (Reddy y col., 1982; Han y col., 1990), ratón (Fraser y col., 1990) y cerdo (Bonilla y col., 1996). Estos factores se producen en el epidídimo y aparentemente su función es evitar que los espermatozoides desarrollen la reacción acrosomal de manera prematura antes de salir del epidídimo.

En la tabla 1 se resumen los cambios que se presentan en la membrana plasmática, durante la maduración en los espermatozoides de mamífero (Yanagimachi, 1981).

TABLA 1.

Modificaciones en la membrana plasmática de los espermatozoides, durante la maduración epididimaria. (Yamaguchi, 1981 y 1994)	
MODIFICACIÓN	LUGAR
Adsorción de antígenos, glicoproteínas, ácido siálico y otros	Testículo, epidídimo y vasos deferentes
Cambios en la distribución de partículas intramembranales (PIMs)	Epidídimo
Alteraciones en la composición de lípidos	Testículo, epidídimo
Alteraciones en las actividades de ATPasa- Na^+ - K^+ y dineína ATPasa	Epidídimo
Disminución en el número de grupos SH expuestos	Epidídimo
Aumento en la carga neta de la superficie	Testículo, epidídimo
Disminución de la fluidez de la membrana	Epidídimo
Presencia de factor (es) discapacitante (s)	Epidídimo

2. FERTILIZACIÓN.

La **fertilización** es la unión de dos gametos, masculino y femenino, que permite que los contenidos nucleares del óvulo y del espermatozoide se fusionen para integrarse en una sola célula (el huevo) que permitirá la generación de un nuevo individuo. Para que el óvulo sea fertilizado, el espermatozoide deberá penetrar la zona pelúcida, pasar el espacio perivitelino y así establecer el contacto con la membrana plasmática del ovocito.

La fecundación puede ser externa ó interna. En la primera, los gametos se liberan al medio ambiente, como en el erizo de mar. En la segunda, los espermatozoides se eyaculan dentro del tracto genital femenino, como en los mamíferos, aquí los espermatozoides sufren cambios que los hacen capaces de fertilizar al ovocito y éstos se conocen como procesos de **capacitación** y **reacción acrosomal**.

3.- CAPACITACION.

La **capacitación** se puede definir como una serie de cambios bioquímicos en la membrana plasmática del espermatozoide, que le permiten experimentar la reacción acrosomal al estar en contacto con las envolturas del ovocito. A pesar de décadas de investigación con sistemas *in vivo* e *in vitro*, todavía se desconocen las bases

moleculares de los procesos bioquímicos que participan en la capacitación. Esto se debe a los siguientes aspectos i) es posible inducir la capacitación *in vitro* por una gran variedad de sistemas, muchos de ellos no pueden extrapolarse directamente a las condiciones *in vivo*, ii) se han usado indistintamente los espermatozoides del epidídimo y los eyaculados para estudiar el proceso, aún cuando se sabe que los mismos se comportan de modo diferente, iii) una susceptibilidad distinta en los espermatozoides de diferentes especies animales a la capacitación *in vivo* e *in vitro*, esto indica que la capacitación es un proceso específico para cada especie y iv) variaciones individuales considerables entre machos de la misma especie.

3.1.- Cambios en el espermatozoide durante la capacitación.

Los espermatozoides ya maduros son capaces de moverse activamente, pero todavía no pueden fertilizar, aparentemente el primer evento de la capacitación es la separación ó modificación de los **factores descapacitantes** (Eng y Oliphant, 1978; Reddy y col., 1982; Han y col., 1990; Fraser y col., 1990; Bonilla y col., 1996).

El desarrollo de nuevas técnicas, como el uso de anticuerpos monoclonales y la bioquímica molecular, han ayudado a establecer las condiciones necesarias para la capacitación de los espermatozoides *in vitro*. Esto ha permitido identificar los componentes que son necesarios para la realización exitosa de este evento. Varias moléculas del tracto genital femenino pueden inducir ó regular la capacitación *in vitro*, entre las que se encuentran: enzimas (ATPasas, neuraminidasa), glicosaminoglicanos, catecolaminas, hormonas esteroides (progesterona, 17- β -

estradiol), proteínas (albúmina, lipoproteínas), nucleótidos cíclicos (AMPc, guanosín 5' monofosfato cíclico ó GMPc), amino ácidos (taurina, hipotaurina, histidina), cationes mono y divalentes (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Zn^{2+}) y sustratos energéticos (como el lactato, y el piruvato), (Yanagimachi, 1994).

El tiempo necesario para que se lleve a cabo la capacitación *in vitro* varía considerablemente de una especie a otra, depende del estado fisiológico del animal y de las condiciones del medio de incubación. El tiempo mínimo de capacitación puede ser menor a una hora en algunas especies como ratón y gato y en otras especies termina después de algunas horas como en los cobayos, conejos y humanos (Reyes y col., 1978; García y col., 1991; Yanagimachi, 1994).

Durante el proceso de capacitación inducido *in vitro* se ha observado que: se liberan ó se modifican algunas proteínas y/ó glicoproteínas periféricas, que se encuentran unidas a la membrana a través de interacciones electrostáticas; se redistribuyen algunas proteínas y/ó glicoproteínas integrales, estas se asocian con la bicapa de lípidos membranales por medio de uniones no covalentes.

Cuando los espermatozoides humanos se incubaron en condiciones de capacitación se presentó una disminución en la cantidad de colesterol en la región de la cabeza, no en el flagelo, en los espermatozoides completos se enmascara esta alteración y en este caso la relación colesterol /fosfolípidos no se modificó (Rosado 1988), la distribución y composición de los fosfolípidos de la membrana plasmática sí se modifica; probablemente estas alteraciones permiten la eliminación de algunos

factores discapacitantes que se adhieren a los espermatozoides en su trayecto por los epidídimos; una más de las alteraciones es la disminución en la cantidad de grupos SH y NH₂ libres (Rosado y col., 1973); disminuye la carga neta negativa en la superficie del espermatozoide, probablemente por la pérdida de ácido siálico durante el proceso (Rosado y col., 1973) y/o por la pérdida de algunos compuestos sulfatados (Legault y col., 1980). La organización de partículas intra-membranales se modifica, lo mismo la composición de carbohidratos sobre la superficie del espermatozoide, en estos últimos, se han hecho evidente por la unión de lectinas fluoresceinadas (Tesarik, 1986). El uso de anticuerpos monoclonales y policlonales contra proteínas propias de los espermatozoides ha permitido analizar con más precisión la distribución de las mismas. Con ésta metodología Peknicova y col. (1994) demostraron que la acrosina, se localizó principalmente en el acrosoma de los espermatozoides de cerdo no capacitados, al inicio de la capacitación se distribuyó en la región postacrosomal y al final se encontró en la región ecuatorial. La proteína se perdió cuando se llevó a cabo la reacción acrosomal. Trejo y Mújica, 1990 demostraron que la calmodulina, una proteína que se une al Ca²⁺, se localizó en el acrosoma y en el flagelo de los espermatozoides de cobayo no capacitados, al término de la capacitación se incrementó su presencia en la pieza media y durante el transcurso de la reacción acrosomal se encontró principalmente en las regiones ecuatorial y postacrosomal de la cabeza.

En la tabla 2 se indica cuáles son los componentes modificados durante la capacitación y la estructura involucrada.

En diferentes especies de mamífero, se han observado cambios característicos en la movilidad de los espermatozoides asociados con la etapa final de la capacitación. Estos cambios se conocen como **hiperactivación**, que es la movilidad vigorosa pero con poco desplazamiento progresivo, los movimientos del flagelo son parecidos a un latigazo ó abanicamiento, la cabeza aumenta su movimiento lateral, en algunas especies, como el hamster, la trayectoria que siguen es en forma de ocho. La movilidad espermática es un parámetro importante, ya que participa en el transporte de los espermatozoides hacia la región ampular de la trompa de Falopio y en la generación de la fuerza requerida para penetrar las capas de células de la granulosa y de la zona pelúcida del ovocito. En los espermatozoides de hamster se demostró que la hiperactivación era precedida por un aumento en las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} y del AMPc (White y Aitken, 1989). Durante la capacitación en los espermatozoides humanos, se estimularon las actividades de adenilil ciclasa, ATPasas y fosfolipasa A2, también se observó una elevación en los niveles de AMPc, que puede desencadenar otra serie de reacciones por medio de la activación de proteínas cinasas dependientes del mismo, (Chavarria y col., 1992)

4.- REACCIÓN ACROSOMAL.

El acrosoma es una estructura parecida a un capuchón, que se localiza en la parte anterior del núcleo del espermatozoide y se encuentra rodeado por una membrana, se divide en dos segmentos: el capuchón ó acrosoma anterior y el segmento ecuatorial ó segmento posterior. En su interior se localizan diversas enzimas

Tabla 2.

Cambios asociados con la capacitación de los espermatozoides (Mansueti, 1971)	
SITIO	EVENTO
MEMBRANA PLASMÁTICA	Pérdida ó alteración de material adsorbido en la superficie (factores descapacitantes)
	Cambios en las propiedades de las
	Pérdida parcial ó localizada de los sitios de unión con lectinas
	Reducción en la carga neta negativa sobre la superficie
	Disminución de los grupos SH y NH ₂
	Cambios en la fluidez membranal
	Liberación de colesterol
	Cambios en los fosfolípidos
	Modificaciones en la distribución y contenido de antígenos de superficie
	Cambios en la distribución de partículas intra-membranales
	Cambios en la membrana relacionados con la permeabilidad a los iones y con sus propiedades osmóticas
	Liberación de Zn ²⁺
	Exposición ó activación de los sitios de incorporación de calcio
MEMBRANA ACROSOMAL	Cambios en la configuración molecular
OTROS	Incremento en el consumo de oxígeno. Incremento en la concentración intracelular de adenosín 3',5' monofosfato cíclico (AMPc)
	Cambios en contenido intracelular del plasmalógeno de colina.

hidrolíticas que constituyen la matriz acrosomal (Yanagimachi, 1994). Una vez finalizado el proceso de capacitación, la reacción acrosomal se induce por medio de un estímulo apropiado. *In vivo*, la capacitación parece ser necesaria para que los espermatozoides pasen a través de las células del *cumulus* que rodean al ovocito, el cual funciona como un filtro para seleccionar a los espermatozoides con capacidad para fertilizar (Cummins y Yanagimachi, 1986). Después de pasar por el *cumulus*, el espermatozoide se une a la zona pelúcida. En algunas especies como ratón y hamster los espermatozoides capacitados con acrosoma intacto se pueden unir a la zona pelúcida y posteriormente llevan a cabo la reacción acrosomal (Saling y col., 1979), en otras especies como el conejo y el cobayo los espermatozoides que previamente han realizado la reacción acrosomal son capaces de unirse a la zona pelúcida y permanecer ahí durante varias horas (Fleming y Yanagimachi, 1982; Kuzan y col., 1984). Sobre el espermatozoide humano existen evidencias contradictorias con respecto a esta unión (Morales y col., 1989; Singer y col., 1985), pero se considera un requisito que los espermatozoides hayan llevado a cabo la reacción acrosomal para que puedan atravesar la zona pelúcida y se fusionen con la membrana plasmática del ovocito.

La reacción acrosomal se considera como un proceso de exocitosis, durante el cual las membranas acrosomal externa y plasmática se fusionan en múltiples segmentos y forman vesículas, la mayor parte del contenido del acrosoma se libera. La membrana acrosomal interna y el segmento ecuatorial, en la mayoría de las especies, se mantienen hasta la fusión entre el espermatozoide y el ovocito. La

reacción acrosomal tiene dos funciones: i) permite que el espermatozoide penetre la zona pelúcida y ii) que se fusione con la membrana plasmática del ovocito. La reacción acrosomal como la capacitación son procesos que requieren de la presencia de Ca^{2+} extracelular (Yanagimachi, 1994). La zona pelúcida es probablemente el estímulo fisiológico que desencadena la reacción acrosomal.

La zona pelúcida es una cubierta libre de células que rodea a los ovocitos de todos los mamíferos y se puede considerar como una matriz extracelular. Está constituida principalmente por tres ó cuatro glicoproteínas, denominadas ZP1, ZP2 y ZP3 (Bleil y Wassarman 1980; Wassarman, 1988; Dean, 1992), las cadenas polipeptídicas presentan diferentes grados de glicosilación y/o sulfatación y heterogeneidad en su carga. La zona pelúcida en el ratón está compuesta por tres glicoproteínas sulfatadas denominadas: ZP1, ZP2 y ZP3 (Wassarman, 1988). La ZP1 es una proteína dimerica con un peso molecular de 200 kDa, presenta uniones disulfuro intermoleculares, que mantiene intacta la estructura tridimensional de la zona pelúcida y forma filamentos entrecruzados con heterodímeros repetidos de ZP2/ZP3, la ZP2 tiene un peso molecular de 120 kDa (en condiciones reductoras y no reductoras) interviene en la unión de los espermatozoides con la zona pelúcida y la ZP3 tiene un peso molecular de 83 kDa, cuantitativamente posee la mayoría ó toda la actividad de la zona para unir espermatozoides y para inducir la reacción acrosomal. La actividad de unión se localiza en los residuos de carbohidratos y se ha relacionado con glicopéptidos pequeños (3.4-4.5 kDa) pero no con la cadena polipeptídica, la actividad para inducir la reacción acrosomal se localiza en las regiones de la proteína y del carbohidrato

(Ward y Kopf, 1993). Estas características le confieren a la zona pelúcida, al menos, dos papeles importantes en el proceso de la fertilización: funciona como receptor primario de los espermatozoides y sirve como inductor de la reacción acrosomal.

La ZP3 aislada induce la reacción acrosomal en espermatozoides homólogos de ratón, humano, cerdo y hamster (Morales y col., 1989; Moller y col., 1990; Arnolt y col., 1999) y en heterólogos como ratón y hamster (Moller y col., 1990).

Otros inductores naturales de la reacción acrosomal *in vitro*, son diversos fluidos y otros compuestos que se encuentran cerca del ovocito como el líquido folicular, el líquido del *cumulus oophorus*, las secreciones de las células de la granulosa y la progesterona (Roldan y Harrison, 1990). Los inductores sintéticos que se han utilizado con más frecuencia para inducir la reacción acrosomal son los ionóforos de calcio como el A23187 y la ionomicina (Reyes y col. , 1978; Tampaichitr y Hansen, 1994; Larson y Miller, 1999).

Los mecanismos por medio de los cuales se induce la reacción acrosomal involucran la participación de receptores que se encuentran en la membrana plasmática sobre la región del acrosoma, la señal se traduce dentro de la célula por medio de segundos mensajeros, que finalmente conducen a la exocitosis.

Algunas proteínas se han considerado que cumplen con las características de un receptor para la ZP3, por ejemplo en los espermatozoides humanos y de ratón la β 1-4 galactosil transferasa se une específicamente al oligosacáridos de la ZP3, no interacciona con las otras proteínas de la zona pelúcida y desencadena la reacción acrosomal (Sullivan y col., 1989; Miller y col., 1992), pero otros investigadores no han

sido capaces de detectar esta enzima (Tulsiani y col., 1990). Cheng y col. (1994) sugieren que en el reconocimiento espermatozoide-ovocito participa una proteína denominada sp56, que se une específicamente al oligosacárido de la ZP3, ésta se localiza en la superficie de los espermatozoides de ratón y tiene un peso molecular de 56 kDa. En los espermatozoides humanos y de ratón se han localizado proteínas que se encuentran fosforiladas en residuos de tirosina en respuesta a la ZP3 (Saling y Lakoski 1985; Brucker y Lipford, 1995).

Entre las proteínas que se han considerado como posibles receptores para la progesterona tenemos al antígeno SAA-7, que se localiza en los espermatozoides humanos, en presencia de anticuerpos contra ésta proteína se inhiben la reacción acrosomal y la fertilización, además se suprime la entrada de Ca^{2+} al interior de los espermatozoides inducida por la progesterona (Brucker y col., 1992. Tesarik y col. (1993) han propuesto como receptor de la progesterona, en los espermatozoides humanos, a una proteína de 94 kDa que se fosforila en presencia de la hormona. Por otro lado Sabeur y col. (1996) en un estudio con espermatozoides humanos, identificaron a dos proteínas con pesos moleculares de 50 y 75 kDa que funcionan como receptores de progesterona y que presentan características similares a las del receptor ácido gama aminobutírico tipo a (GABAa).

En el espermatozoide humano se han identificado varias vías de segundos mensajeros que pueden participar en la fertilización, estas incluyen a las proteínas G que se unen a guanósín trifosfato (GTP), proteínas cinasas dependientes de AMPc, de GMPc y de fosfolípidos. Es posible que estas vías interaccionen entre sí para

asegurar una respuesta óptima en el lugar y tiempo correctos durante el proceso de la fertilización (Brelfeld y col., 1994).

Para que ocurra la reacción acrosomal se requiere de modificaciones precisas entre las concentraciones intra y extracelulares de algunos iones inorgánicos. Sin embargo se sabe poco acerca de los requerimientos de estos cambios iónicos durante la capacitación y además muchos de ellos presentan controversia. Como en otros tipos de células, en los espermatozoides se debe mantener una regulación precisa de los gradientes iónicos a través de sus membranas, particularmente a través de la membrana plasmática. Finalmente es importante mencionar que el Ca^{2+} extracelular se requiere para completar todo el proceso que permite al espermatozoide fecundar al ovocito.

5.- TRANSPORTE DE IONES.

En las membranas de muchas estirpes celulares se encuentran tres diferentes transportes de iones: canales de iones, intercambiadores ó antipuertos y las adenosín trifosfatasa ó ATPasas

-Canales de iones, constituidos por proteínas que forman poros hidrofóbicos que atraviesan la membrana, tienen selectividad por los iones, permitiendo que algunos pasen y otros no, los canales no están abiertos continuamente, en la mayoría de los casos se abren en respuesta a un estímulo específico. Un estímulo para abrir estos canales es: un cambio de voltaje a través de la membrana (**canales dependientes**

de voltaje, entre los que se encuentra el canal de calcio), estos canales se abren cuando la membrana se despolariza, produciéndose un gradiente electroquímico por medio del cual las membranas adquieren la posibilidad de trasportar iones; el estrés mecánico ó la unión de un ligando (canales dependientes de ligando). Existen tres tipos de canales de Ca^{2+} : T, N y L, que se clasifican por su respuesta a diferentes voltajes, velocidad de desactivación (tiempo en que se cierran) y susceptibilidad para ser bloqueados por dihidropiridinas y/ó metales de transición (Nowycky, 1991) ver tabla 3.

Tabla 3.

Características de los tres tipos de canales de Ca^{2+} .

Tipo de canal	Umbral de activacion	Velocidad de desactivación (mseg)	Sensibles a dihidropiridinas	Sensibles a bloqueadores iónicos
T	Bajo(-70mv)	20-50	No	$Ni^{2+} > Cd^{2+}$
N	Alto(-20mv)	50-80	No	$Cd^{2+} > Ni^{2+}$
L	Alto(-10 mv)	>500	Si	$Cd^{2+} > Ni^{2+}$

-Intercambiador ó antipuerto Na^+/Ca^{2+} son proteínas que utilizan la energía almacenada por el gradiente electroquímico de Na^+ para intercambiar calcio por sodio, con una estequiometría de 1:3. Puede mover calcio hacia el exterior ó hacia el

interior de la célula, dependiendo del gradiente de Na^+ . La proteína se ha caracterizado y tiene un PM de 108 kDa, que aparentemente atraviesa la membrana 12 veces y tiene un dominio intracelular que comparte una homología con los dominios de fijación de la calmodulina (Pietrobon y col 1990).

Muchos de los gradientes iónicos también se regulan por la presencia de alguna ATPasa específica cuya actividad depende del metabolismo del ATP. Hasta la fecha la mayoría de las ATPasas que bombean iones se clasifican dentro de los siguientes tipos de enzimas:

1- **ATPasas tipo F**, se encuentran en las membranas de mitocondrias, de cloroplastos y de algunos organismos, por ejemplo en *Escherichia coli*. Son enzimas que no forman intermediarios fosforilados como parte de su mecanismo de reacción y que aunque exhiben actividad de ATPasa, generalmente están involucradas en la síntesis de ATP. Utilizan los gradientes electroquímicos de protones que se generan por la respiración ó la fotosíntesis.

2.- **ATPasas tipo P** estas enzimas utilizan la energía liberada de la hidrólisis de ATP para inducir la traslocación electrónica neutra de cationes, particularmente H^+ , Na^+ , K^+ y Ca^{2+} , como es el caso de retículo endoplásmico y en células de músculo. Las ATPasas Tipo P funcionan cíclicamente a través de estados conformacionales que requieren la formación de intermediarios fosforilados, se inhiben específicamente con vanadato y en el caso de la ATPasa- Na^+ - K^+ por ouabaína. La ATPasa- Na^+ - K^+ se requiere para mantener el balance osmótico y para estabilizar el volumen celular. Las células de eucariontes mantienen bajas

concentraciones de calcio (10^{-7} moles l^{-1}) en el citosol, a pesar de que la concentración de calcio en el exterior sea mucho mayor (10^{-3} mmoles l^{-1}), para mantener este equilibrio se requiere de la actividad de la ATPasa- Ca^{2+} que transporta activamente calcio hacia el exterior de las células.

3.- H^+ -ATPasas vacuolares tipo V, se denominan así porque se descubrieron en las membranas de vacuolas, son un tipo de enzimas que se han descrito desde hace 15 años. Estructuralmente se parecen a las F-ATPasas, son proteínas formadas por ocho subunidades, presentan dos dominios, uno periférico con cinco subunidades en donde se localiza el sitio catalítico y un dominio membranal que contiene tres subunidades que participan en el transporte de protones a través de la membrana, al mismo tiempo hidrolizan ATP. Inicialmente, estas enzimas se relacionaron con modificaciones en el pH de compartimentos intracelulares, ahora se sabe que también funcionan en la membrana plasmática como una bomba de protones eficiente, como resultado de su actividad se generan gradientes de protones, que se reflejan en los cambios de pH intracelular (Nelson, 1991; Gillies y col., 1992; Martínez-Zaguilán y col., 1993) y de pH extracelular (Breton y col., 1996). Las H^+ -ATPasas tipo V no se inhiben con vanadato ni con ouabaina pero si se inhiben específicamente con el antibiótico macrólido bafilomicina A1 (BfA1) (Bowman y col., 1988), bombean protones sin requerir de un contra-ión, son las responsables de la acidificación de los endosomas (Clague y col., 1994), lisosomas (Bowman y col., 1988), gránulos cromafínicos (Flatmark y col., 1982) y vesículas recubierta de clatrina (Bowman y col., 1988), entre otras estructuras. Participan en eventos celulares que

requieren de la acidificación del lumen y de la formación de un gradiente electroquímico, como: dislocación del ligando-receptor en los endosomas, selección y concentración de proteínas en el aparato de Golgi y en gránulos secretores y concentración de neurotransmisores en vesículas sinápticas (Nelson, 1999). Las H⁺-ATPasas tipo V se expresan en las membranas plasmáticas de algunos tipos de células del epidídimo y en aquellas de los vasos deferentes, su función es mantener un pH luminal ácido, el 80 % del transporte de protones en los vasos deferentes se inhibió en presencia de bafilomicina A1 (Breton y col., 1996).

6.- REGULACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE IONES EN EL INTERIOR DE LOS ESPERMATOZOIDES.

La movilidad de los espermatozoides, capacitación y la reacción acrosomal dependen de la presencia de iones inorgánicos, principalmente de Ca⁺² (García y col., 1991; Gatti y col., 1993), Na⁺ (Fraser y col., 1993) y Zn⁺² (Delgado y col., 1975), así como de algunos transportadores iónicos que regulan la cantidad precisa que se requiere en el interior del espermatozoide. Dentro de estos transportadores se encuentran las ATPasas las cuales parecen estar involucradas en los procesos previos a la fertilización. Nuestro grupo de trabajo reportó que la actividad de la ATPasa-Ca²⁺ en los espermatozoides de cobayo se localizó en las membranas: plasmática, periacrosomal y acrosomal externa. Cuando se llevó a cabo la reacción acrosomal la enzima se redistribuyó y se estimuló en los espermatozoides libres de

acrosoma al comparar con los controles. La actividad de la ATPasa- Na^+ - K^+ fue mayor en la membrana plasmática que en la membrana acrosomal y se estimuló en las dos regiones durante la capacitación (García y col. 1991). Por otro lado Ashraff y col., (1982) encontraron que la actividad de la ATPasa- Na^+ - K^+ se localizó principalmente en el flagelo de los espermatozoides de cerdo y de la ATPasa- Ca^{2+} en la membrana plasmática de la cabeza y del flagelo. Working y Meizel (1982) reportaron la presencia de una ATPasa- dependiente de Mg^{2+} que bombea protones en los espermatozoides de hámster y que se inhibe en presencia de Ca^{2+} . En los espermatozoides de bovino la actividad de la ATPasa predominante es la dependiente de Mg^{2+} y la actividad de ATPasa dependiente de Ca^{2+} constituye menos del 2% de la actividad total (Ruffo y col., 1984).

En presencia de quercetina y ácido etacrínico, antagonistas de la ATPasa- Ca^{2+} , se acortó el tiempo de capacitación y la reacción acrosomal se incrementó (Roldan y Fleming, 1989).

Por otro lado los espermatozoides del epidídimo de bovino, pero no los eyaculados, acumulan Ca^{2+} *in vitro*, este efecto se debe a la presencia en el plasma seminal de un factor que inhibe el transporte del ión calcio (Fraser y col., 1990).

Meizel y Turner (1993) demostraron que la tapsigargina, un inhibidor de la bomba de calcio del retículo endoplásmico, induce la reacción acrosomal en los espermatozoides capacitados de humano, Parrish y col., (1999) observaron el mismo efecto en los espermatozoides de bovino. Debido a que no existe ninguna evidencia de la presencia de retículo endoplásmico en los espermatozoides de los mamíferos

se desconoce cuál es el sitio preciso de la movilización de calcio en presencia de tapsigargina. Spungin y Breitbart (1996) reportaron que las membranas acrosomales aisladas poseen una bomba de ATP-Ca²⁺ que se inhibió con tapsigargina. En este mismo contexto, Dragileva y col., (1999) en un estudio con espermatozoides de bovino y de carnero demostraron que: 1) el Ca²⁺ se acumuló en almacenes no mitocondriales por medio de una bomba de calcio dependiente de ATP, 2) la bomba de calcio se inhibió en presencia de tapsigargina y provocó un incremento rápido de Ca²⁺ intracelular, que se observó primero en la cabeza del espermatozoide y después en la pieza media, el efecto se llevó a cabo únicamente cuando había calcio en el exterior y 3) la presencia de tapsigargina desencadenó la reacción acrosomal en espermatozoides previamente capacitados. Estos hallazgos parecen indicar que en el acrosoma se encuentra la reserva interna de calcio y en su membrana la ATPasa-Ca²⁺ sensible a tapsigargina.

Existe información de la presencia de los canales dependientes de voltaje y su participación en el control de la entrada de calcio en los espermatozoides, Zeng y Clark (1995) reportaron que las membranas plasmáticas espermatozoides de bovino y de ratón se hiperpolarizan durante y después de la capacitación, proponen que los canales de tipo T pueden tener una participación en este proceso.

Los espermatozoides de ratón presentan canales de calcio tipo T, éstos se inhibieron con amilorida, nifedipina y Ni²⁺ (Santi y col., 1996). La defosforilación de los residuos de tirosina que se encuentran en este tipo de canales estimulan su actividad

(Arnolt y col., 1997). Los canales de calcio también están presentes en los espermatozoides de carnero (Backock y Pfeiffer, 1987) y de humano (Linares-Hernández y col., 1998), en este último mostraron que la despolarización de la membrana de los espermatozoides no capacitados activó canales de calcio insensibles a nifedipina y que se bloquean con Ni^{2+} .

Las evidencia fisiológicas y farmacológicas que se tienen hasta la fecha indican que la activación ó apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje participa en la reacción acrosomal. Los siguientes reportes ejemplifican los avances que se tienen al respecto: en este proceso inducido con la neoglicoproteína manosa unida a albúmina de suero bovino, en espermatozoides humanos se estimuló la entrada de Ca^{2+} , éste efecto se inhibió en presencia de los bloqueadores de canales de calcio mibefradil y Ni^{2+} , pero cuando la reacción acrosomal se indujo en presencia de progesterona los inhibidores no tuvieron efecto (Blackmore y Gisoldts, 1999). En otro estudio, en presencia de progesterona, el transporte del Ca^{2+} hacia el interior de los espermatozoides humanos se inhibió con mibefradil y con pimozida, que son inhibidores de canales de calcio dependientes de voltaje, en este caso la reacción acrosomal solamente se inhibió en presencia de mibefradil y el pimozida la estimuló. Estos datos indican que los espermatozoides humanos presentan canales de calcio, su participación en la reacción acrosomal inducida con progesterona debe aclararse (Garcia y Meizel, 1999a). Arnolt y col., (1999) por su parte reportaron la presencia de canales de calcio de bajo voltaje en los espermatozoides de ratón. Estos canales se activaron durante la inducción de la reacción acrosomal en presencia de la

glicoproteína ZP3. Aparentemente diferentes tipos de canales de calcio se abren en presencia de diferentes estímulos durante la reacción acrosomal.

Por otro lado, con respecto al intercambiador Na^+/H^+ , Garcia y Meizel (1999a) demostraron su presencia en los espermatozoides humanos capacitados, un derivado de amilorida (EIPA) inhibió su actividad sin afectar la reacción acrosomal inducida con progesterona. Los autores sugieren que la regulación del pH_i dependiente de Na^+/H^+ en los espermatozoides de humano no es suficiente para bloquear el inicio de la reacción acrosomal en presencia de la progesterona.

Se ha demostrado que los espermatozoides mantienen un pH de reposo ácido (Babcock y col., 1983; Gatti y col., 1993; Zeng y col., 1996) y que durante la capacitación el pH intracelular se alcaliniza (Hyne y Garbers, 1981; Hyne, 1984; Working y Meizel, 1983; Vredenburg-Wilberg y Parrish, 1995; Zeng y col., 1996). En el presente trabajo se estableció la hipótesis que los espermatozoides de conejo expresan ATPasas de tipo V en su membrana plasmática para mantener un pH alcalino. La presencia de estas ATPasas explica, en parte, los mecanismos que controlan el pH intracelular en estas células. De hecho existen dos propiedades específicas que hacen que la regulación del pH sea única en los espermatozoides de los mamíferos y quizás también de los invertebrados: i) alcalinización del citosol en los espermatozoides de rata (Wong y col., 1981) y de cobayo (Hyne y col., 1984) insensible a la acción de amilorida, un inhibidor del antipuerto Na^+/H^+ , que generalmente se ha asociado con un incremento en el pH intracelular en células somáticas (Grinstein y col., 1989), ii) alcalinización de los espermatozoides de

somáticas (Grinstein y col., 1989), ii) alcalinización de los espermatozoides de mamífero (Babcock y Pfeifer, 1987) e invertebrados (Lee y Garbers, 1986) está relacionada con cambios en el voltaje de la membrana, mientras que la regulación del pH interno en las células somáticas se relaciona comúnmente con la actividad de un intercambiador Na^+/H^+ electroneutro (Babcock y Pfeifer 1987; Grinstein y col., 1989; Martínez-Zaguilan y col., 1993).

En función de toda esta información decidimos estudiar el mecanismo por el cual la ATPasa vacuolar participa en la secuencia de los procesos de capacitación y reacción acrosomal, que conforman la preparación del espermatozoide para la fertilización. El conocimiento de esta investigación pretende ayudar a entender el mecanismo que regula la fertilidad en el macho y que posiblemente permita manipular alguna vía en el espermatozoide para modular la fertilidad y la anticoncepción.

II.- HIPÓTESIS.

Las H⁺-ATPasas tipo V participan en la regulación de la capacitación y la reacción acrosomal, en los espermatozoides de conejo.

III.- OBJETIVOS GENERALES.

Para ayudar a entender los cambios moleculares que se presentan durante la capacitación decidimos a) determinar si las H⁺-ATPasas (Tipo V) se expresan en la membrana plasmática de los espermatozoides de mamífero, b) determinar si este tipo de H⁺-ATPasas contribuyen a las modificaciones del pH intracelular que ocurren durante la capacitación y c) estudiar si estas enzimas participan en el ó los mecanismo(s) que regulan el desarrollo de la reacción acrosomal inducida por la presencia del ionoforo de calcio A23187. Para estos estudios usamos el conejo como nuestro modelo animal, porque es una de las pocas especies en las cuales la capacitación se puede estudiar en los espermatozoides eyaculados y de epidídimo que se obtienen del mismo individuo.

IV.- OBJETIVOS PARTICULARES.

Demostrar que el método seleccionado para inducir la capacitación y la reacción acrosomal, es confiable y reproducible.

Demostrar que el método seleccionado para determinar el porcentaje de espermatozoides capacitados y que presentan reacción acrosomal, es confiable y reproducible.

Determinar qué efecto tiene el inhibidor de V-ATPasa, bafilomicina A1, sobre la capacitación y la reacción acrosomal de los espermatozoides de la cola del epidídimo y eyaculados.

Valorar la capacidad fertilizadora de los espermatozoides eyaculados.

V.- MATERIAL Y MÉTODOS.

Reactivos y soluciones.

Clorotetraciclina (CTC), complejo isotiocianato de fluoresceína y lectina de *Pisum sativum* (FITC-PSA), azul brillante de Coomassie G-250 (CBB), ácido N-(2-hidroxi-etil) piperazina-N-2-etanosulfónico (Hepes), piruvato de sodio, tris-hidroxi-metil—amino-metano (Tris), lactato de sodio, D(+) glucosa, Percoll, albúmina de suero bovino (libre de ácidos grasos), bafilomicina A1, poli-L-lisina, dimetil sulfóxido (DMSO), acetato de amonio y otras sales fueron de Sigma Chemical (St. Louis Missouri, E.U.A.), ionoforo de calcio A23187 de Boehringer M (Alemania). Otros reactivos fueron de grado analítico o mejor.

Las soluciones de bafilomicina A1 (0.05 mmoles l⁻¹) y A23187 (10 mmoles l⁻¹) se prepararon en DMSO concentrado, se almacenaron y checaron como indican Bowman y cols. (1988) y Köhn y cols. (1997) respectivamente.

Los medios de incubación utilizados fueron los siguientes:

Medio A- Hepes 30 mmoles l⁻¹, KCl 5 mmoles l⁻¹, NaCl 100 mmoles l⁻¹, lactato de sodio 21 mmoles l⁻¹, piruvato de sodio 2.5 mmoles l⁻¹, pH 7.6. 305 miliosmoles l⁻¹.

Medio A enriquecido- al medio A se le adicionaron: glucosa 13.9 mmoles l⁻¹ y albúmina de suero bovino libre de ácidos grasos 1 mg ml⁻¹.

Medio A capacitante- al medio A enriquecido se le adicionó CaCl₂ 2.5 mmoles l⁻¹.

Buffer de fosfatos salino (conocido por sus siglas en inglés como **PBS**)- NaCl 200

mmoles l⁻¹, KCl 2.7 mmoles l⁻¹, Na₂HPO₄ 8 mmoles l⁻¹, KH₂PO₄ 1.5 mmoles l⁻¹.

Medio Brackett- NaCl 112 mmoles l⁻¹, KCl 4.02 mmoles l⁻¹, CaCl₂ 2.5 mmoles l⁻¹, Na₂HPO₄ 0.83 mmoles l⁻¹, MgCl₂ 0.52 mmoles l⁻¹, NaHCO₃ 37 mmoles l⁻¹ l, glucosa 13.9 mmoles l⁻¹, piruvato de sodio 1.25 mmoles l⁻¹, albúmina bovina cristalina 1mg l⁻¹, pH7.8, (305 miliosmoles l).

Material Biológico.

Se utilizaron conejos machos Nueva Zelanda blancos, sexualmente maduros, con fertilidad probada, de 10 a 15 meses de edad con un peso promedio de 3.5 Kg. Los animales permanecieron en el bioterio del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS, disponiendo de alimento y agua *ad libitum*, con periodos de luz oscuridad de 12 x 12 horas y temperatura controlada de 18° C. Los eyaculados se colectaron dos veces por semana con la ayuda de una vagina de plástico, con funda de látex, a una temperatura de 45° C (Bredderman y col., 1967). Se eliminaron las muestras que presentaron contaminación con orina, sangre ó sedimentos, se seleccionaron aquellas que presentaron espermatozoides con movimientos progresivos calificados como buenos y excelentes y sin anomalías aparentes. Para obtener los espermatozoides de la cola del epidídimo, los conejos se sacrificaron por dislocación cervical seis días después de la última eyaculación, se desangraron cortando la yugular, los testículos se disecaron, se ligaron las venas y el conducto del epidídimo con hilo de algodón, el tejido vascular se perfundió con solución salina fisiológica NaCl 0.154 mmoles l⁻¹. Posteriormente se separó el epidídimo del testículo, se ligó con hilo quirúrgico entre las regiones de la pieza media y la cola del epidídimo. Los

espermatozoides se obtuvieron por perfusión, se inyectaron 3 ml de medio A (37° C) a través del conducto deferente, se hicieron pequeñas incisiones en el tejido y se colectó la suspensión de espermatozoides en un tubo de plástico, la muestra se centrifugó y se resuspendió en 1.5 ml del mismo medio (Mercado y col., 1992). Los eyaculados se diluyeron en medio A.

El tratamiento que se describe a continuación fue el mismo para las muestras de las dos fuentes, las suspensiones se centrifugaron, a 900 x g durante 20 min., a temperatura ambiente, en un gradiente de Percoll formado por dos fases: una fase inferior con 1.5 ml de una solución de Percoll al 95% en HEPES 10 mmoles l⁻¹ y NaCl 154 mmoles l⁻¹, pH 7.4 y una fase superior con 2.0 ml de una solución de Percoll al 75 % en medio A (Suárez y col., 1986 modificado por nuestro grupo). Los espermatozoides se recuperaron en la fase inferior, se lavaron por centrifugación a 500 x g durante 5 min., se resuspendieron en medio A enriquecido y se determinó el número de células utilizando una cámara de Neubauer. Los espermatozoides se diluyeron en medio A enriquecido (controles sin calcio) ó en medio A capacitante (con CaCl₂ 2.5 mmoles l⁻¹) a una concentración de 2.5 x10⁷ espermatozoides ml⁻¹.

Procedimiento.

Los siguientes estudios se hicieron por duplicado.

CAPACITACION.

Las suspensiones de espermatozoides de la cola del epidídimo y eyaculados se incubaron en presencia y en ausencia del inhibidor de H⁺-ATPasas (bafilomicina A1 BfA1) (Bowman y col., 1988).

Las muestras se dividieron en alícuotas de 0.5 ml (2.5×10^7 espermatozoides ml⁻¹) y se adicionaron a microtubos de 1.5 ml con los siguiente medios:

(a)-100 µl del medio sin bafilomicina A1 (controles).

(b)-100 µl de la dilución apropiada de bafilomicina A1 para tener una concentración final de 0.2 µmoles l⁻¹.

Para inducir la capacitación, los espermatozoides se incubaron durante 6 horas a 37° C con agitación suave y en tubos de centrifuga de polipropileno, cónicos, bajo una atmósfera de 5% CO₂ / 95% aire. Al finalizar el tiempo de la capacitación, se tomaron alícuotas de 25 µl, mismas que se utilizaron para determinar la viabilidad usando el método de eosina / nigrosina y la movilidad por observación directa en el microscopio.

También se tomaron alícuotas de 50 µl para valorar el porcentaje de espermatozoides capacitados por el método de unión a la clorotetraciclina (CTC) (Green y col., 1994).

REACCION ACROSOMAL.

Las muestras incubadas previamente con y sin BfA1 se lavaron dos veces por centrifugación a 500 x g por 5 min. En el medio capacitante, se resuspendieron en 200 μ l el mismo medio y se dividieron en dos partes: una de ellas se tomó como control, a la que se adicionó DMSO y el ionóforo de calcio A23187 10 μ moles l^{-1} en DMSO para inducir la reacción acrosomal..

En los casos donde se realizaron los estudios de inducción de reacción acrosomal en presencia y en ausencia de BfA1 se incluyeron las muestras de espermatozoides eyaculados y no las del epidídimo. Se dejó una de las muestras incubada previamente con BfA1 sin lavar para tener continuamente la presencia del inhibidor, se adicionó A23187 inmediatamente después de la capacitación y se continuó la incubación como se indica abajo.

En todos los casos después de adicionar A23187 se continuó la incubación por 15, 30 y 45 min, a 37°C, bajo una atmósfera de CO₂ 5% / aire95%. En cada tiempo se determinó el porcentaje de espermatozoides que presentaron reacción acrosomal utilizando los métodos de CBB (Miller y col., 1993) y lectina de FITC-PSA (Cross y Meizel, 1989).

Valoración del porcentaje de espermatozoides capacitados.

Después de 6 horas de capacitación, una alícuota de 50 μ l de la suspensión de

espermatozoides se mezcló con 50 μl de una solución de CTC (CTC 750 $\mu\text{moles l}^{-1}$, NaCl 130 mmoles l^{-1} , cisteína 5 mmoles l^{-1} , Tris-Cl 20 mmoles l^{-1} , pH 7.8) después de 10 segundos de incubación, se adicionaron 10 μl de una solución de paraformaldehído al 12% en Tris 0.5 moles l^{-1} , pH 7.4 (Green y col., 1994). Se colocaron 10 μl de esta mezcla sobre un portaobjetos (a 37° C), se mezclaron con una solución del antioxidante 1,4-diazabicyclo-(2,2,2)-octano (DABCO) (0.22 moles l^{-1}) en 90% glicerol para evitar la disminución de la fluorescencia por fotoblanqueo (Köhn col., 1997) y se observaron inmediatamente en un microscopio con epifluorescencia Zeiss con a filtro 2FI (405 nm de excitación, 460 nm de emisión y filtros de barrera de 510 nm). Se contaron 200 espermatozoides en cada una de las condiciones experimentales y se clasificaron de acuerdo al patrón de fluorescencia que se observó en la región de la cabeza.

Fertilización *in vitro*.

El estudio de fertilización *in vitro* se llevó a cabo para probar la capacitación de los espermatozoides, los eyaculados se incubaron como ya se indicó durante un periodo de 6 horas en medio A capacitante sin BfA1 (controles), cada 2 horas se tomó una muestra y se adicionó a un sistema de fertilización *in vitro*, siguiendo el método de Brackett y Oliphant (1975). En cada experimento se utilizaron 4 conejas Nueva Zelanda Blancas, adultas, como donadoras de ovocitos, se les aplicaron 75 UI de gonadotropina coriónica humana (hCG) por vía intravenosa, 16 horas después se recuperaron los ovocitos sobre cajas petri de plástico (Falcon Plastics, Oxnard, CA)

perfundiendo los oviductos con medio Brackett con 20 % de suero de sangre de conejo (previamente calentado a 50 ° C por 30 min.). Al final de cada tiempo del periodo de capacitación, los espermatozoides y los ovocitos se incubaron juntos bajo aceite mineral, durante 28-30 horas a 37° C en una atmósfera de 5% CO₂, 95% aire. Las muestras se examinaron para valorar el porcentaje de ovocitos segmentados, que se consideró indicativo de la capacidad fertilizante de los espermatozoides. Se usó un microscopio de contraste de fases como está descrito por Reyes y col.,(1978).

Valoración de la reacción acrosomal con la lectina de *Pisum sativum* unida a isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA).

Para este procedimiento se siguió el método descrito por Mendoza y col. (1992) modificado por Köhn y col. (1997). Después de la incubación con A23187, las células se lavaron dos veces en medio A sin albúmina (500 x g, 5 min.); con 100 µl de los espermatozoides resuspendidos se hicieron frotis sobre portaobjetos y se secaron al aire. Después de permeabilizar los espermatozoides por inmersión en 100% metanol, durante 10 min., los frotis se cubrieron con 100 µl de una solución de FITC-PSA (150 µg ml⁻¹ en PBS, pH 7.4) y se incubaron por 30 min. a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Después de la incubación los frotis se lavaron con agua destilada, se secaron al aire, y se trataron por 15 min., con una solución del antioxidante DABCO para evitar el fotoblanqueo (Köhn y col., 1997) y se observaron inmediatamente por epifluorescencia, usando un microscopio Zeiss con un filtro 2FI

(405 nm excitación, 460 nm fluorescencia y filtros de barrera de 510 nm).

Valoración de la reacción acrosomal por el método de azul brillante de Coomassie (CBB).

Alícuotas de 100 μ l de los espermatozoides incubados con A23187, se fijaron durante 10 min con una solución de paraformaldehído al 4 %, preparada en Tris-HCl 0.5 moles l^{-1} , pH 7.1. Los espermatozoides fijados se lavaron dos veces con 1:3 v/v acetato de amonio 0.1 moles l^{-1} (1200xg 10 min.). El paquete de espermatozoides fijados, se resuspendieron en 25 μ l de la misma, se hicieron frotis sobre un portaobjetos cubierto con polilisina y se secaron al aire. Los frotis se tiñeron por inmersión durante 1.5 h en una solución de CBB G-250 preparada in 50% de metanol y 10% de ácido acético. Los frotis teñidos se lavaron con acetato de amonio 0.1 moles l^{-1} , se cubrieron con PBS-glicerol 50% (v/v) (Miller y col., 1993), se observaron y contaron en un microscopio Zeiss con una amplificación 100X.

En todos los experimentos se siguieron los procedimientos de doble ciego, las determinaciones en el microscopio se realizaron por dos observadores independientes, se contaron 200 espermatozoides sobre cada laminilla. En todos los casos se clasificaron a los espermatozoides de acuerdo al patrón de fluorescencia ó al patrón de tinción de sus acrosomas y se calculó el porcentaje de espermatozoides capacitados ó con reacción acrosomal.

Determinación del pH intracelular (pHi).

Para la determinación del pH, se utilizaron las muestras de espermatozoides eyaculados de tres conejos diferentes. Los espermatozoides se incubaron en las condiciones de capacitación que se indicaron anteriormente, en ausencia y en presencia de bafilomicina A1 ($0,2 \mu\text{moles l}^{-1}$). Para determinar los valores de pHi se siguió el método reportado por Linares-Hernández y col. (1998), los espermatozoides capacitados se incubaron durante 40 minutos a 37°C , con el reactivo fluorescente acetoximetil éster de bicarboxietilcarboxifluoresceína (BCECF-AM) ($2 \mu\text{moles l}^{-1}$), el reactivo atraviesa libremente la membrana y en el interior de las células se libera el éster por acción de las esterasas, se forma el BCECF que funciona como sonda para protones y es impermeable a las membranas, después de la incubación las muestras se lavaron para eliminar el reactivo no unido, se resuspendieron en 1 ml de medio A sin albúmina y se tomó una alícuota de $40 \mu\text{l}$, la cual se mezcló con 2 ml de medio A en una celda de cuarzo, la suspensión de espermatozoides se mantuvo con agitación continua a 37°C , durante el tiempo que se requirió para determinar la fluorescencia de la muestra. Se usó una relación de longitudes de onda de excitación de 500/439 nm y de emisión a 550 nm, se usó en un espectrofluorómetro Photon Technology International. Al final de cada determinación se calibraron los valores de pHi, liberando *in situ* el colorante unido, para lo cual se adicionó tritón x 100 al 0.5 % v/v, enseguida se adicionaron alícuotas de HCl al 3.5 % y se hicieron las determinaciones de fluorescencia como ya se indicó y de los correspondientes del pH en un potenciómetro. Los datos se tabularon y analizaron con un programa de

computadora denominado Felix, el cual relaciona los valores de fluorescencia con el pH.

Estadística.

Los análisis estadísticos se hicieron usando el paquete de SigmaStat V 2.0 (Sigma-Aldrich Co., San Louis, Missouri, USA). Los porcentajes de reacción acrosomal se transformaron en las raíces cuadradas de sus arco senos (Sokal y Rohlf, 1969) y los datos transformados se analizaron por la prueba de ANOVA de dos vías y la prueba de Dunnet de dos colas. Los valores de F que corresponden a $p < 0.05$ se consideraron significativamente diferentes.

VI.-RESULTADOS.

El antibiótico clorotetraciclina (CTC) es un compuesto fluorescente, quelante de cationes divalentes, su fluorescencia aumenta si la unión se realiza en un medio no polar. Cuando se une a los espermatozoides la intensidad de la fluorescencia depende de la presencia y localización del Ca^{2+} (Saling y col., 1987),

El patrón de fluorescencia de la tetraciclina en los espermatozoides de conejo es similar al descrito para espermatozoides de humano (Cross y Meizel 1989, Lee y col., 1987). Los espermatozoides control, incubados en un medio sin calcio y en medio A (enriquecido) presentaron poca fluorescencia, en este caso la tetraciclina se unió principalmente a la pieza media de los espermatozoides (fig. 1a). Los espermatozoides incubados durante 4 horas en condiciones de capacitación mostraron una fluorescencia brillante, particularmente en la región acrosomal anterior (fig. 1b), al final del periodo de capacitación (6 horas) se observó una banda brillante sobre la cabeza del espermatozoide (fig. 1c, flechas). Ambos patrones de fluorescencia se usaron para evaluar la capacitación de los espermatozoides.

La capacitación de los espermatozoides se determinó inicialmente por medio de la fertilización in vitro (Tabla 4). Estos resultados indican un incremento lineal en el número de ovocitos fertilizados con los espermatozoides previamente capacitados durante las primeras 6 horas. Los resultados que se obtuvieron después de 8 horas

de incubación fueron similares a los de 6 horas. Con este tiempo la mayoría de los espermatozoides mostraron el patrón de fluorescencia descrito en la fig. 1c, por lo que se decidió usar este tiempo como periodo de capacitación.

Cuando se analizaron los patrones de tinción con CTC de los espermatozoides de conejo incubados durante 6 horas, en presencia de calcio y en ausencia de bafilomicina, se puede observar que hubo una diferencia significativa ($p < 0.005$) entre el porcentaje de espermatozoides capacitados que provenían del epidídimo (66 ± 7) y eyaculados (43 ± 11). La adición del inhibidor de H^+ -ATPasas al medio de capacitación disminuyó estos porcentajes a menos de la mitad en los dos casos (Tabla 5).

La movilidad y el porcentaje de espermatozoides vivos (del epidídimo y eyaculados), no fue significativamente diferente entre los controles y los tratados después de las 6 horas de incubación en condiciones de capacitación. En experimentos piloto la presencia de A23187 en el medio de incubación por más de 45 minutos disminuyó marcadamente el porcentaje de espermatozoides de conejo vivos y móviles, comparados con los controles. Por lo tanto, en nuestros estudios se incluyeron solamente 15, 30 y 45 minutos de incubación con el ionóforo, en los cuales la viabilidad y la movilidad de los espermatozoides no disminuyeron significativamente. Los espermatozoides de conejo con reacción acrosomal pueden identificarse con precisión por medio de los métodos de tinción con CBB (fig. 2a) y con FITC-PSA (fig. 2b). En el caso de CBB, la región acrosomal se tiñó de color azul, formando un puente apical, indicando que el acrosoma esta intacto en los espermatozoides sin

reacción. En la mayoría de los espermatozoides sin reacción acrosomal, la presencia del acrosoma se acompañó de un incremento en la tinción de toda la mitad anterior del espermatozoide, con una banda distintiva en la región ecuatorial. La ausencia de tinción azul se interpretó como una característica de los espermatozoides con reacción acrosomal (fig. 2a, flechas). En el caso de la tinción con FITC-PSA, los espermatozoides mostraron fluorescencia brillante en la mitad anterior de la cabeza. Durante la reacción acrosomal no hay fluorescencia o solamente se observa una banda en la región ecuatorial que se debe a la pérdida de la membrana acrosomal (fig. 2b, flechas). En cuanto al porcentaje de reacción acrosomal inducida con A23187 en el grupo control (capacitados en ausencia de inhibidor de ATPasas), no se encontraron diferencias significativas en los 3 tiempos estudiados, entre los espermatozoides teñidos con FITC-PSA (12 ± 4 , 23 ± 6 y 31 ± 7 a los 15, 30 y 45 minutos, $n=7$) y aquellos teñidos con CBB (14 ± 5 , 24 ± 5 y 29 ± 6 , $n=9$) por lo tanto en el resto de los experimentos la reacción acrosomal se valoró únicamente con CBB.

Después de las 6 horas de capacitación en ausencia de bafilomicina A1 y del tratamiento con A23187 por 15, 30 y 45 minutos, tanto los espermatozoides de epididimo como los eyaculados mostraron un incremento casi lineal en cuanto al porcentaje de reacción acrosomal (Tabla 5). Este comportamiento también se observó en los espermatozoides capacitados en presencia de bafilomicina A1, en este caso hubo una disminución notable en el porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal en todos los tiempos estudiados (Tabla 6). También es de notar que en condiciones control existen diferencias sustanciales entre el número de

espermatozoides de epidídimo que se capacitan y el número de espermatozoides que experimentan la reacción acrosomal después de 45 minutos de incubación con A23187 (Tablas 5 y 6). Esta diferencia no es tan clara en los espermatozoides eyaculados. Un porcentaje pequeño (<6%) de espermatozoides incubados sin A23187 experimentaron una reacción acrosomal espontánea. Por lo tanto todos los porcentajes de reacción acrosomal se corrigieron restando este valor.

En la fig. 3 se muestra el comportamiento de los espermatozoides eyaculados bajo diferentes condiciones experimentales, durante la reacción acrosomal. Podemos observar un incremento lineal en el porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal inducida con A23187 después de que se capacitaron en ausencia de bafilomicina A1. La presencia de bafilomicina A1 $0.2 \mu\text{moles l}^{-1}$, durante el periodo de capacitación provocó una disminución significativa de la reacción acrosomal en todos los tiempos estudiados. Se puede observar que cuando el inhibidor estuvo de manera continua durante la capacitación y durante la estimulación de la reacción acrosomal, el porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal fue similar al que se presentó cuando la bafilomicina se incorporó solamente durante la capacitación. Finalmente este antibiótico estuvo presente únicamente durante la incubación con A23187, la presencia del inhibidor de H^+ -ATPasas tipo V, no tuvo efecto sobre la inducción de la reacción acrosomal con el ionóforo.

En la figura 4 se muestra un ejemplo de la determinación del pH intracelular (pHi) (que es representativo de 3 experimentos), los trazos corresponden a la fluorescencia de BCECF en las muestras de espermatozoides incubados en las

siguientes condiciones: A) capacitados en ausencia de inhibidor, B) no capacitados ó control y C) capacitados en presencia de bafilomicina A1 $0.2 \mu\text{moles l}^{-1}$. También se hizo la determinación del pHi con espermatozoides no capacitados en presencia de bafilomicina y si el inhibidor se adicionó al final de la capacitación, en estos casos el trazo fue similar al del control y no se incluyeron en la gráfica, se indican la adición de tritón X 100 0.5 % (T) y de HCl 3.5 % que se hicieron para titular el compuesto fluorescente. Los valores de pHi fueron los siguientes: los espermatozoides control $\text{pHi}=7.06\pm 0.05$, espermatozoides capacitados en ausencia del inhibidor $\text{pH}=7.23\pm 0.052$ y espermatozoides capacitados en presencia de bafilomicina A1 ($0.2 \mu\text{moles l}^{-1}$) $\text{pH}=7.07 \pm 0.037$. Se observó que el pHi se incrementó durante la capacitación y que la presencia del inhibidor de H^+ -ATPasas (bafilomicina A1) durante este proceso evitó dicho incremento. La bafilomicina no tuvo efectos sobre el pHi cuando se adicionó a los espermatozoides control ni tampoco cuando se adicionó al final de la capacitación (los valores de pHi fueron similares a los del control).

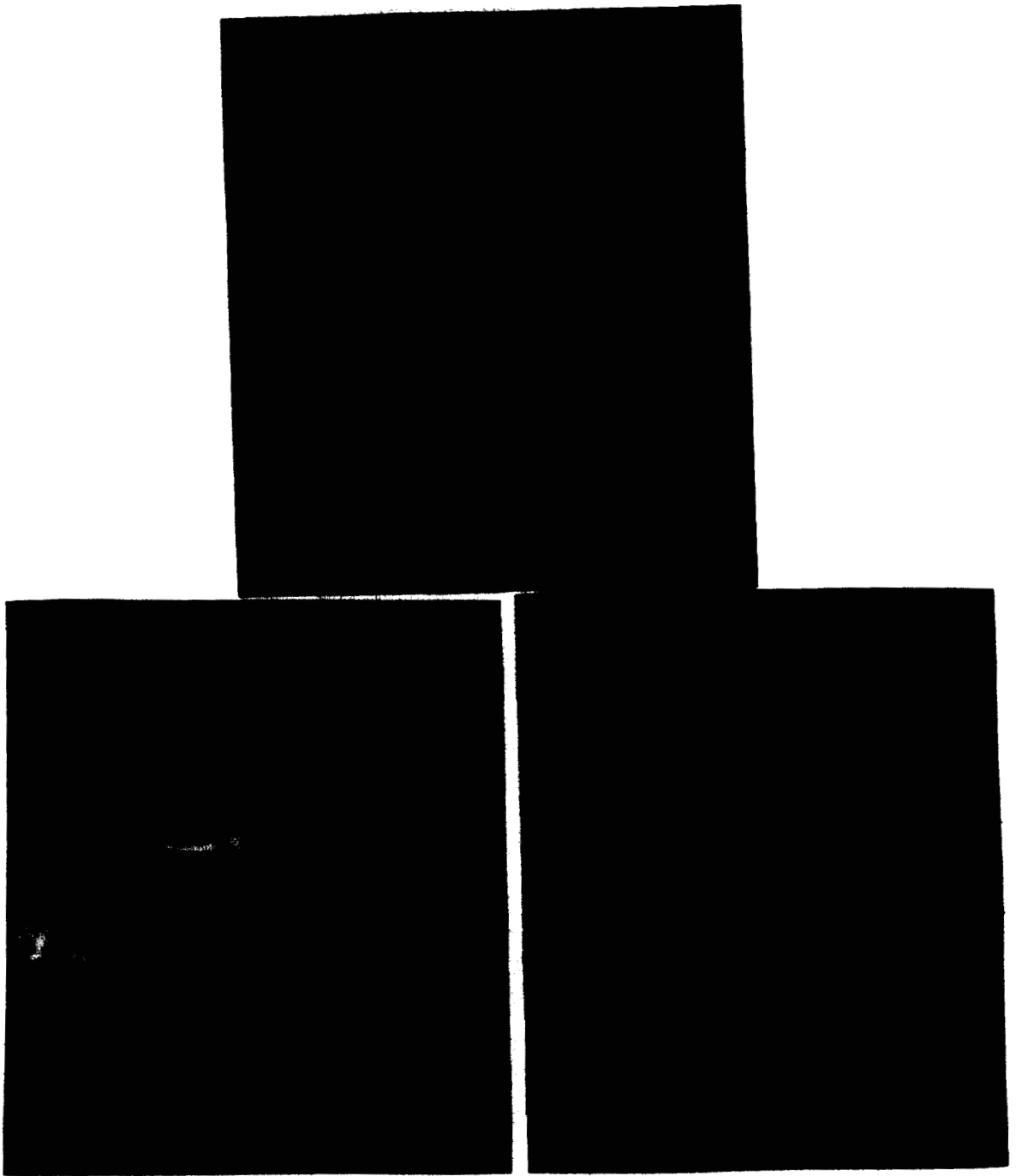


Fig. 1.

Fig. 1. Unión de clorotetraciclina a espermatozoides de conejo. **(a)** Patrón de tinción que se observa en espermatozoides control incubados en medio sin Ca^{2+} . Casi no se observa fluorescencia en la cabeza del espermatozoide, únicamente la pieza media está levemente fluorescente. **(b)** Los espermatozoides después de la incubación en medio capacitante, presentan fluorescencia distintiva, particularmente sobre la región acrosomal anterior de la cabeza. Se observa claramente una banda de fluorescencia brillante en la región ecuatorial. Las flechas indican espermatozoides no capacitados. **(c)** El patrón de fluorescencia al final del periodo de capacitación, 6 h de incubación en presencia de CaCl_2 $2.5 \text{ mmoles l}^{-1}$, los espermatozoides capacitados presentan una banda de fluorescencia brillante alrededor de su cabeza (flechas). Flechas dobles indican espermatozoides no capacitados.

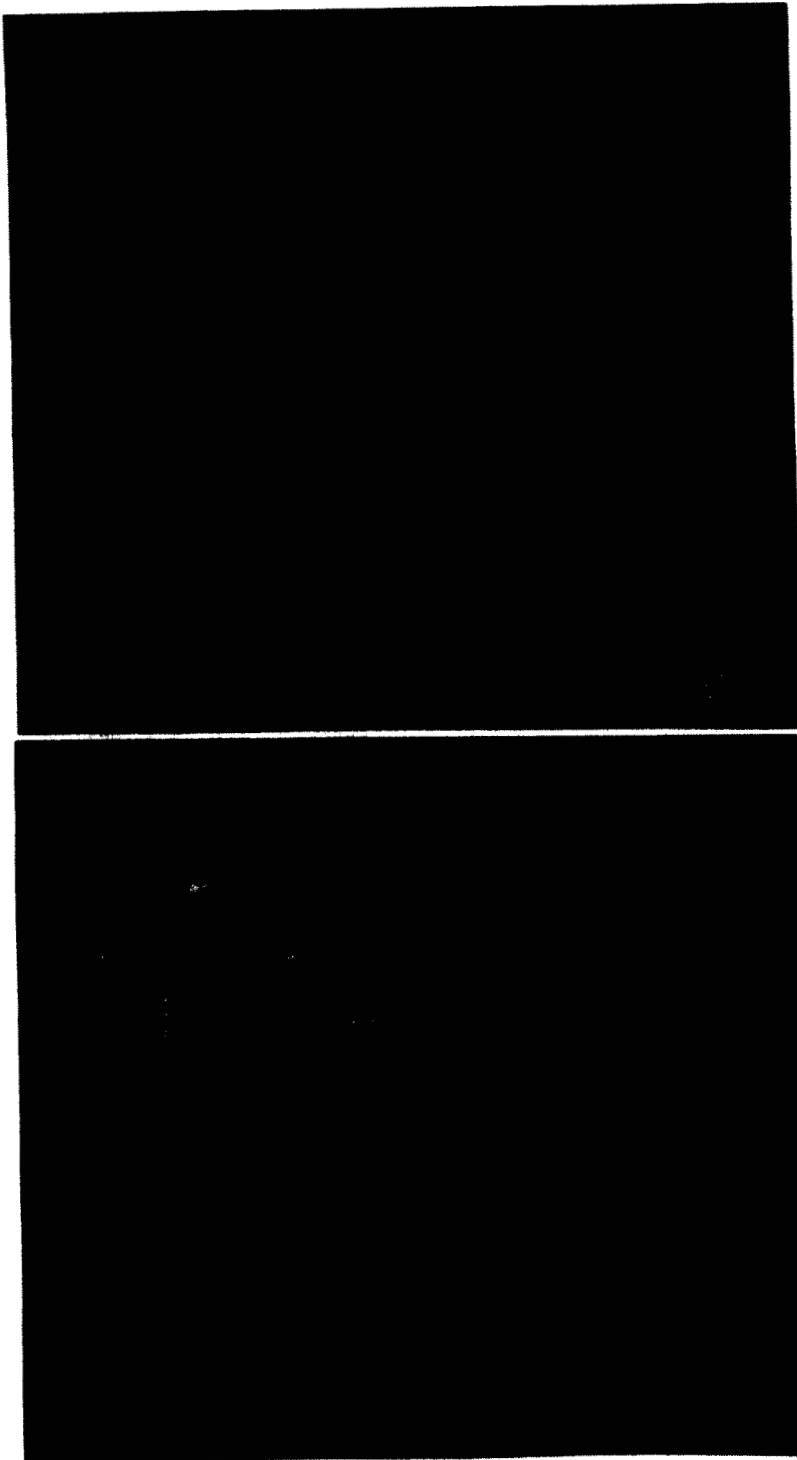


Fig.2.

Fig. 2. Patrones de espermatozoides de conejo teñidos con CBB **(a)** ó con FITC-PSA **(b)**. En **(a)** la tinción de la región acrosomal, formando un puente apical distintivo, indica la presencia de acrosomas intactos en espermatozoides no reaccionados. La falta de tinción azul es característica de espermatozoides con reacción acrosomal (flechas). En **(b)** los espermatozoides no reaccionados presentan fluorescencia brillante en la mitad anterior de la cabeza. La falta de fluorescencia ó la presencia de solamente una banda fluorescente en región ecuatorial indica la pérdida de membranas acrosomales (flechas).

Tabla 4.
Capacidad fertilizante de los espermatozoides de conejo.

espermatozoides	tiempo de capacitación (horas)	o v o c i t o s		
		número total	numero de segmentados	% de segmentados*
eyaculados	2	20	3	15 ^a
	4	28	7	25 ^b
	6	36	16	44 ^c
	8	25	12	48 ^c
epidídimo	2	24	5	21 ^a
	4	36	13	36 ^b
	6	42	22	52 ^c
	8	28	17	61 ^c

Los espermatozoides eyaculados y de la cola del epidídimo se incubaron en condiciones de capacitación, 2.5×10^7 espermatozoides ml^{-1} , en medio A capacitante, 37°C , atmósfera de CO_2 5%/aire 95%, durante 2, 4, 6 y 8 horas, al final de cada tiempo se lavaron con medio Brackett y se inseminaron los ovocitos de coneja con 10^6 espermatozoides por sistema, después de 28 a 30 horas de incubación se determinó el porcentaje de ovocitos que presentó segmentación.

(*) Las letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) cuando los datos se compararon por medio de la prueba χ^2 para proporciones.

Tabla 5.

**Capacitación de espermatozoides de conejo,
en presencia y en ausencia de bafilomicina A1**

condiciones de incubación (6 horas)	% de espermatozoides de epidídimo	% de espermatozoides eyaculados
sin Ca ²⁺	5 ± 3	4 ± 3
con Ca ²⁺	66 ± 7	43 ± 11 [§]
Ca ²⁺ + bafilomicina	25 ± 11*	16 ± 8*

Los espermatozoides de la cola de epidídimo y eyaculados se incubaron en las condiciones que se indican en la tabla 4, en este caso el tiempo de incubación fue de 6 horas, se muestran las diferentes adiciones, medio sin Ca²⁺ (control), con Ca²⁺ 2.5 mmol l⁻¹ en ausencia (capacitados) y en presencia de bafilomicina A1 0.2 μmol l⁻¹. Se realizaron 7 experimentos.

Los números indican el promedio ± desviación estándar,

[§] Indica la existencia de diferencias significativas (p <0.05) entre los resultados obtenidos con espermatozoides de epidídimo y eyaculados.

*Indica la existencia de diferencias significativas (p <0.05) entre los resultados obtenidos en ausencia y en presencia de bafilomicina A1 en el medio capacitante.

Tabla 6.

Reacción acrosomal en los espermatozoides de conejo capacitados en presencia y en ausencia de bafilomicina A1.

espermatozoides						
			epidídimo		eyaculados	
tiempo de incubación con A23187 (min.)	n	bafilomicina durante la capacitación		bafilomicina durante la capacitación		
		(-)	(+)	(-)	(+)	
15	7	15 ± 4 ^a	4 ± 3 ^{a*}	12 ± 5 ^a	4 ± 2 ^{a*}	
30	9	27 ± 5 ^b	8 ± 6 ^{ab*}	23 ± 6 ^b	8 ± 3 ^{ab*}	
45	9	39 ± 3 ^c	11 ± 7 ^{b*}	31 ± 5 ^{b*}	14 ± 4 ^{b*}	

Los espermatozoides se capacitaron en medio A con Ca²⁺, en presencia ó en ausencia de bafilomicina A1 0.2 µmoles l⁻¹. Después de 6 horas de incubación a 37° C, las muestras se lavaron y resuspendieron en el mismo medio, se incubaron con A23187 10 µmoles l⁻¹ durante los tiempos indicados. En cada tiempo para valoró el porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal por el método de tinción con azul brillante de Coomassie (CBB).

Los números indican el promedio ± la desviación estándar, n es el número de experimentos. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias estadísticas (p<0.05) entre los tiempos de incubación.* Indica la existencia de diferencias significativas (p <0.05) entre los resultados obtenidos con espermatozoides del epidídimo y eyaculados. *Indica la existencia de diferencias significativas (p <0.05) entre los resultados obtenidos en ausencia y en presencia de bafilomicina A1.

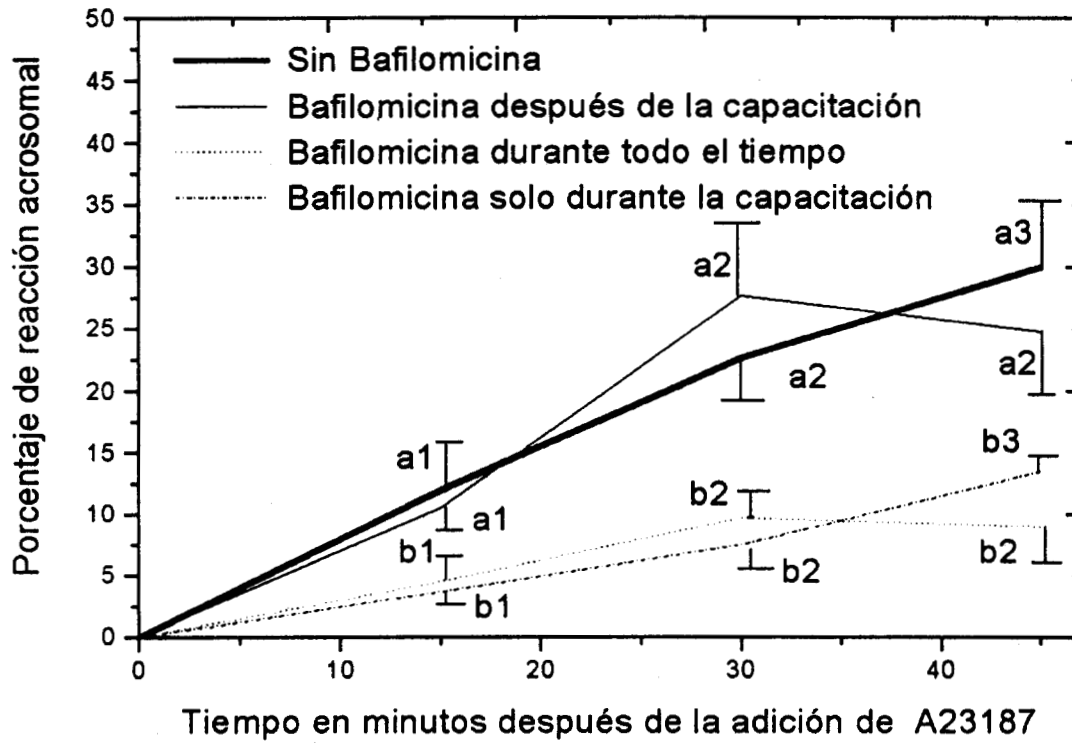


Fig. 3. Reacción acrosomal contra tiempo de incubación, inducida con $10 \mu\text{mol l}^{-1}$ de A23187. Los espermatozoides eyaculados de conejo se incubaron en las condiciones experimentales indicadas en la gráfica. Las barras indican la desviación estándar. Las letras indican la existencia de diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre los datos obtenidos bajo distintas condiciones. Los números indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los datos con distintos tiempos de incubación, pero en las mismas condiciones experimentales (ANOVA de dos vías). (ver tabla 6).

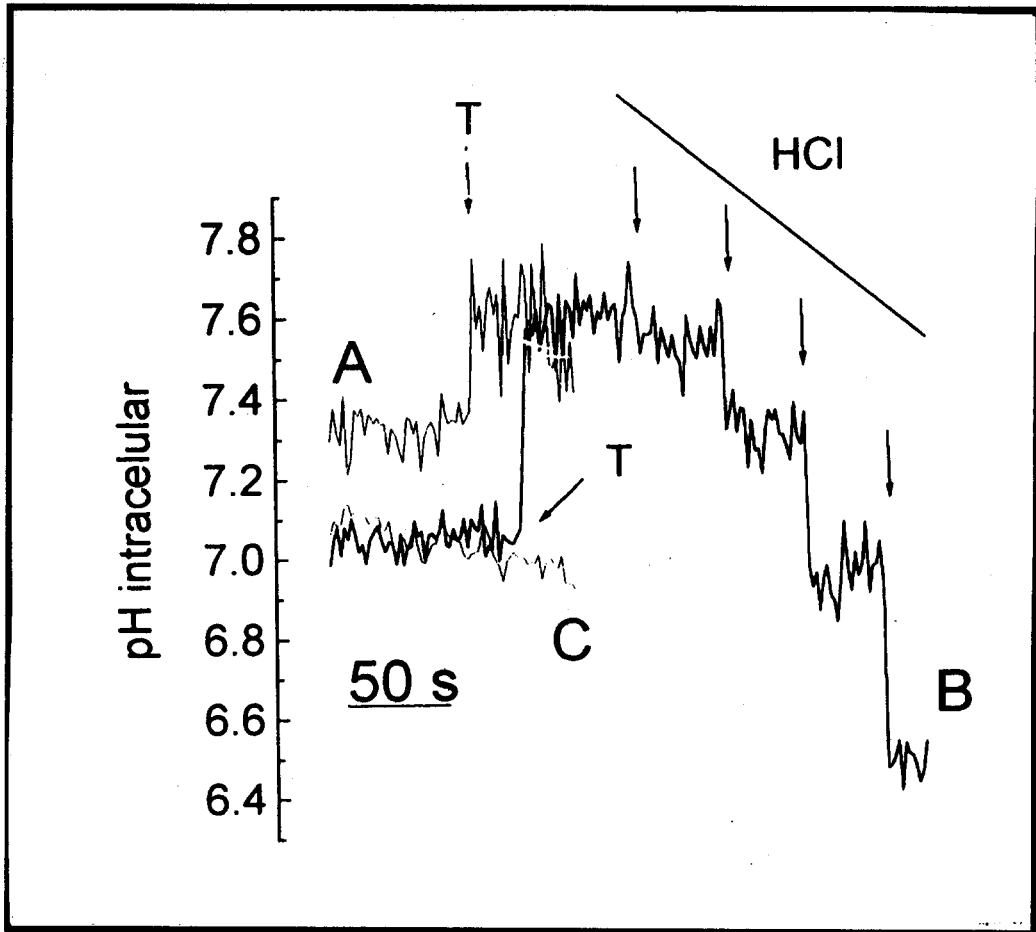


Fig. 4.

Fig. 4. Determinación del pH intracelular (pHi). Se muestran los trazos registrados en un espectrofluorómetro, los cuales corresponden a la fluorescencia de la sonda para protones BCECF. Las muestras de espermatozoides eyaculados de conejo se purificaron y se incubaron, en las siguientes condiciones: **A)** capacitados en ausencia de inhibidor, **B)** no capacitados ó control y **C)** capacitados en presencia de bafilomicina A1 $0.2 \mu\text{mol l}^{-1}$. También se determinó el pHi de los espermatozoides no capacitados en presencia de bafilomicina y con el inhibidor adicionado al final de la capacitación, en estos casos los trazos fueron similares a los del control y no se incluyeron en la gráfica, se indican las adiciones de tritón X 100 (T) al 0.5 % y de HCl al 3.5 % para la titulación del compuesto fluorescente. Este es un ejemplo representativo de 3 experimentos. Otras condiciones se indican en métodos.

VII.-DISCUSIÓN.

La determinación de la reacción acrosomal con el complejo isotiocianato de fluoresceína y lectina de *Pisum sativum* se ha usado con resultados adecuados con los espermatozoides de algunas especies de mamíferos (Cross y Meizel 1989, Yanagimachi 1994). En este estudio nosotros encontramos que el porcentaje de espermatozoides de conejo con pérdida de acrosoma fue valorado adecuadamente tanto por la tinción con FITC-PSA como por la tinción con CBB. Debido a que la evaluación fue más fácil con el método de CBB, decidimos usarlo en lugar de la tinción con FITC-PSA. En las condiciones experimentales establecidas para los espermatozoides de conejo, después de 6 horas de capacitación y después de la incubación con A23187 $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$, tanto los porcentajes de espermatozoides con reacción acrosomal, como el tiempo del proceso fueron comparables con los datos reportados previamente por nuestro grupo (Reyes y cols. 1978) y con los encontrados en otras especies de animales (Working y Meizel 1983; Cross y col., 1989; Miller y col., 1993; Köhn y col., 1997). Nosotros encontramos que después de 45 minutos de incubación con A23187, el porcentaje de espermatozoides viables y móviles cayó drásticamente, resultados que están de acuerdo con lo reportado por Köhn y col., (1997) para espermatozoides de humano.

Por otro lado, se ha observado que los espermatozoides de mamífero alcanzan la madurez total y la capacidad fertilizante durante su tránsito por el epididimo y los

espermatozoides de la cauda del epididimo se consideran tan maduros y fértiles como los espermatozoides eyaculados. Sin embargo muchos reportes apoyan la idea de que, in vitro, los espermatozoides del epidídimo son más capaces de fertilizar al ovocito que los eyaculados (Yanagimachi 1994). Estas diferencias se han adscrito a la adsorción o unión de algún componente del plasma seminal durante la eyaculación, que pueden dar un grado de estabilización a la membrana plasmática del espermatozoide (Yanagimachi 1994). Nuestros resultados mostraron que en condiciones control, durante el periodo de capacitación de 6 horas un porcentaje más alto de los espermatozoides del epidídimo se capacitaron en comparación con los espermatozoides eyaculados (66 ± 7 contra 43 ± 11 , respectivamente). Estas diferencias entre los espermatozoides de epidídimo y eyaculados subsistieron durante el desarrollo de la reacción acrosomal. De manera interesante, estas diferencias se eliminaron al incluir bafilomicina en el medio de capacitación, lo cual sugiere que las variaciones entre los espermatozoides de epidídimo y eyaculados pueden ser bioquímicas y estructurales.

Durante la capacitación, los espermatozoides exhiben incrementos drásticos en su actividad metabólica, glucólisis y consumo de oxígeno, que finalmente se reflejan en la adquisición del patrón de movilidad conocido como hiperactivación (Yanagimachi, 1994). La hiperactivación demanda un tremendo consumo de actividad metabólica y por lo tanto puede tener un efecto dramático en el pH_i, induciendo acidificación significativa en el citoplasma. Sin embargo se ha descrito que durante la capacitación del espermatozoide se tiene un aumento importante en el pH_i (Meizel y Dreamer

1978; Working y Meizel 1983; Uguz y col., 1994; Vredenburg y Parrish 1995; Zeng y col., 1996). En las células de mamíferos el pH intracelular se regula a través de la colaboración de tres procesos metabólicos: el intercambio Na^+/H^+ (Boron 1986; Moolenaar, 1986), el transporte de HCO_3^- (Gillies y col., 1992) y la actividad de la H^+ -ATPasa (tipo P y tipo V) de la membrana plasmática (Turrini y col., 1989; Nelson 1991; Martínez-Zaguilán y col., 1993; Breton y col., 1996).

Se ha propuesto que en las células que presentan alta actividad metabólica, particularmente con una alta tasa de glucólisis, como en algunas células tumorales, el mantenimiento de un pH_i alto puede depender de la actividad de V-ATPasas en su membrana plasmática (Gillies y col., 1990; Perona y Serrano 1988). En relación a este hecho, Martínez-Zaguilán y col., (1993), encontraron que durante la incubación de seis líneas de células tumorales se presentó una alcalinización relacionada con la actividad metabólica, que se acompañó de un incremento significativo en el pH_i , la presencia de bafilomicina A1 evitó la alcalinización y el efecto fue dependiente de la concentración del inhibidor. Es posible sugerir que un fenómeno similar podría ocurrir en el espermatozoide de conejo, debido a que la adición de bafilomicina A1 a la suspensión de células del epidídimo y del eyaculado disminuye significativamente el porcentaje de capacitación después de seis horas de incubación. Ya que la bafilomicina A1 es un inhibidor altamente específico de las H^+ -ATPasas tipo V (Bowman y col., 1988), nuestros resultados indican que en el espermatozoide de conejo y quizás en otros espermatozoides, se expresa una H^+ -ATPasa localizada en la membrana plasmática, cuya actividad puede ser necesaria para mantener la

alcalinización citoplásmica que acompaña a la capacitación.

Como ya se ha mencionado la capacitación está acompañada de una alcalinización interna en los espermatozoides de varias especies. Nuestros resultados al respecto mostraron que el pH intracelular se incrementó en los espermatozoides de conejo capacitados y que la presencia de bafilomicina A1 durante la capacitación evitó dicho incremento, el inhibidor no tuvo efecto cuando se adicionó al final de la incubación. Este hallazgo junto con la inhibición del patrón de capacitación en los espermatozoides de conejo, son evidencias que apoyan la posibilidad de que la V-ATPasa participa en la regulación del proceso de capacitación y que aparentemente en la reacción acrosomal ya no se requiere.

La importancia de la participación de la ATPasa tipo V en la capacitación se apoya en los siguientes hechos: i) la alcalinización celular puede ocurrir casi en completa ausencia de HCO_3^- (Gatti col., 1993); ii) la actividad del intercambio Na^+/H^+ disminuye cuando el pH_i se incrementa, siendo casi inactiva a valores de $\text{pH}_i > 7.5$ (Moolenaar, 1986) y no parece ser un sistema muy eficiente en los espermatozoides de humano (Garcia y Meizel, 1999b), que la hace un regulador ineficiente de la alcalinidad intracelular.

Los estudios del presente trabajo se llevaron a cabo para determinar si la H^+ -ATPasa tipo V se presenta en la membrana plasmática del espermatozoide y si participa en la regulación del pH_i durante la capacitación. También es importante definir si las ATPasas vacuolares pueden tener un papel en la regulación del pH intra-acrosomal durante la reacción acrosomal inducida con el ionóforo de calcio A23187, por ejemplo

Working y Meizel (1983) reportaron que el pH intra-acrosomal del espermatozoide de hámster se incrementa aproximadamente en una unidad, antes de que ocurra la reacción acrosomal. Este cambio notable en el contenido acrosomal parece ser independiente de calcio, pero requiere concentraciones altas de K^+ . Las ATPasas vacuolares originalmente se describieron como enzimas casi exclusivas de las membranas de los organelos intracelulares, incluyendo las vesículas secretoras, vesículas cubiertas con clatrina (Stone y col., 1983), sinaptosomas, aparato de Golgi, endosomas y lisosomas (Schneider y col., 1983) las V-ATPasas regulan el pH ácido que se requiere para la función adecuada de cada uno ellos (Bowman y col., 1988). Es interesante notar, que una vez que los espermatozoides de conejo se capacitaron, la bafilomicina A1 no interfirió con la inducción de la reacción acrosomal. Estos resultados indican que la actividad de este antibiótico durante la capacitación se debió realmente a su interacción con las ATPasas de protones localizadas en la membrana plasmática (Martínez-Zaguilán y col., 1993) y que la regulación del pH en el interior del acrosoma puede seguir diferentes mecanismos bioquímicos.

Además de las modificaciones observadas durante la capacitación, se ha demostrado que un incremento en el pH es indispensable para la activación de los espermatozoides de erizo de mar (Shapiro y col., 1985) y es necesario durante el inicio de la movilidad en los espermatozoides de mamífero (Babcok y col., 1983; Carr y col., 1985; Carr y Acott 1989; Gatti y col., 1993). Sin embargo, los mecanismos bioquímicos que regulan los cambios en el pH intracelular durante la iniciación, modulación y activación de la movilidad del espermatozoide, todavía son poco

entendidos. Nuestros resultados sugieren que la presencia de la ATPasa tipo V en la membrana del espermatozoide de mamífero puede explicar algunos de los cambios observados en el pH_i que acompañan la adquisición y el control de la movilidad en éstas células. Están en progreso los experimentos que van a ayudar a demostrar la importancia de estas enzimas en los espermatozoides de otras especies de mamíferos, bajo otras condiciones experimentales, tales como la iniciación de la movilidad de los espermatozoides.

VIII .- CONCLUSIONES.

En el presente trabajo se demostró que la actividad de la H^+ -ATPasa tipo V que regula el pH_i en diversas estirpes celulares, participa en la regulación de la capacitación de los espermatozoides de epidídimo y eyaculados de conejo. Este hallazgo es una contribución que abre una nueva posibilidad para explicar como se puede modular el pH interno de los espermatozoides.

Durante la capacitación y la reacción acrosomal se ha observado que en el interior de los espermatozoides, se modifican las concentraciones de algunos iones inorgánicos, principalmente el calcio, además durante dichos procesos se presenta una alcalinización interna en los espermatozoides. Para regular todos estos cambios, los espermatozoides poseen toda una serie de moduladores, entre los que se encuentran las ATPasas, los canales iónicos y los intercambiadores de iones. Con respecto a la regulación del pH interno se ha demostrado la participación del intercambiador de Na^+/H^+ y del transporte de HCO_3^- en los espermatozoides de diversas especies de mamíferos, pero debido a que la alcalinización puede ocurrir en casi completa ausencia de HCO_3^- y porque la actividad del intercambiador Na^+/H^+ depende del pH externo, estos sistemas no parecen funcionar adecuadamente en éstas células. La importancia de la presencia de las H^+ -ATPasas tipo V radica en que estas enzimas pueden ser reguladores más eficientes que los sistemas anteriores, por lo menos durante el proceso de capacitación.

IX.- BIBLIOGRAFÍA.

Arnolt C, Kazam IG, Visconti PE, Kopf GS, Villaz M, Florman HM (1999) Control of low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitating. Proc Natl Acad Sci USA 96: 6757-6762.

Arnolt C, Lemos JR, Florman HM (1997) Voltage-dependent modulation of T-type calcium channels by protein tyrosine phosphorylation. EMBO J 16: 1593-1599.

Ashraff M, Peterson RN, Russell LD (1982) Activity and localization of cation-dependent ATPases on the plasma membrane of boar spermatozoa. Biochem. Biophys Res Commun 107: 1273-1278.

Babcock DF, Pfeiffer DR (1987) Independent elevation of cytosolic $[Ca^{2+}]$ and pH of mammalian sperm by voltage-dependent and pH-sensitive mechanisms. J Biol Chem 262:15041-15047.

Babcock DF, Rufo GA, Lardy HA (1983) Potassium-dependent increases in cytosolic pH stimulate metabolism and motility of mammalian sperm. Proc Natl Acad Sci USA 50:1327-1331.

Bedford UM (1963) Changes in the electrophoretic properties of rabbit spermatozoa during passage through the epididymis. Nature 200: 1180-1182.

Bedford UM, Calvin HI, Cooper GW (1973) The maturation of spermatozoa in the human epididymis. J Reprod Fertil (suppl) 18: 199-213.

Bellvé AR, Zheng W, Martinova Y (1993) Recovery, capacitating, acrosome reaction and fractionation of sperm. Methods in Enzimology 225: 113-153.

Blackmore PF, Gisoldts (1999) The neoglycoprotein mannose-bovine serum albumin, but not progesterone, activate T-type calcium channels in human spermatozoa. Mol Hum Reprod 5: 498-506.

Bleil JD, Wassarman PM (1980) Mammalian sperm-egg interaction: identification of glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm. Cell 20: 873-882.

Bonilla E, Velasco R, Casas R, Ducolomb Y, Betancourt M (1996) Inhibition of the pig sperm acrosome reaction by a decapacitation factor from pig seminal plasma. Medi Sci Res 24: 75-77.

Boron WF (1986) Intracellular pH regulation in epithelial cells. Ann Rev Physiol

43:377-388.

Bowman EJ, Siebers A, Altendorf K (1988) Bafilomycins: A class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:7972-7976.

Brackett BG, Oliphant G (1975) Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol Reprod* 12: 260-274.

Bredderman PJ, Foote RH, Yassen AM (1967) An improved artificial vagina for collecting rabbit semen. *J Reprod Fertil* 7: 401-403.

Brelfeld P, Faridi A, Zaneveld LJD, DeJonge CJ (1994) The zona pellucida-induced acrosome reaction of human spermatozoa is mediated by protein kinases. *Fertil Steril* 61: 536-541.

Breton S, Smith PJ, Lui B, Brown D (1996) Acidification of the male reproductive tract by a proton pumping (H^+)-ATPase. *Nat Med* 2:470-472.

Brucker C, Sandow BA, Blackmore PF, Lipford GB, Hodgen GD (1992) Monoclonal antibody AG7 inhibits fertilization post sperm-zona binding. *Mol Reprod Dev.* 33: 451-462.

Brucker C, Lipford GB (1995) The human sperm acrosome reaction: physiology and regulatory mechanisms. An update. *Human Reprod* 1: 51-56.

Carr DW, Acott TS (1989) Intracellular pH regulates bovine sperm motility and protein phosphorylation. *Biol Reprod* 41:907-920.

Carr DW, Usselman MC, Acott TS (1985) Effect of pH lactate and viscoelastic drag on sperm motility: a species comparison. *Biol Reprod* 30:913-925.

Chavarria ME, Reyes A, Huacuja L, Rosado A (1992) Capacitation and acrosome reaction of human spermatozoa. An assisted reproduction approach. *Arch Med Res* 23:256-264.

Cheng A Le T, Palacios M, Bookbinder LH, Wassarman PM, Suzuki F, Bleil JD (1994) Sperm-egg recognition in the mouse: characterization of sp56, a sperm protein having specific affinity for ZP3. *J Cell Biol* 125: 867-878.

Clague MJ, Urbe S, Aniento F, Gruenberg J (1994) Vacuolar ATPase activity is required for endosomal carrier vesicle formation. *J. Biol. Chem* 269:21-24.

Crabo BG, Hunter AG (1974) Sperm maturation and epididymal function. En: *Control of Male Infertility*. Edited por Sciarra JJ, Markland C, Speidell JJ. Harper-Row, pg.:

2-25.

Cross NL, Meizel S (1989) Methods of evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biol Reprod* 41:635-641.

Cross NL, Morales P, Fukuda M, Behboodi E (1989) Determining acrosomal status of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) sperm by fluorescence microscopy. *Am J Primatology* 17:157-163.

Cummings JM, Yanagimachi R (1986) Development of ability to penetrate the cumulus oophorus by hamster spermatozoa in vitro, in relation to the timing of the acrosome reaction. *Gamete Res* 15: 187-212.

Dean J (1992) Biology of mammalian fertilization: role of the zona pellucida. *J Clin Invest* 89: 1055-1059.

Delgado NM, Huacuja L, Pancardo RM, Rosado A (1975) Modification of human metabolism by the induced release of intracellular zinc. *Life Sci* 16: 1483-1485.

Dragileva E, Rubinstein S, Breitbart H (1999) Intracellular Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase regulates calcium influx and acrosome exocytosis in bull and ram spermatozoa. *Biol Reprod* 61: 1226-1234.

Eccleston ED, White TW, Howard JB, Hamilton DW (1994) Characterization of a cell surface glycoprotein associated with maturation of rat spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 37:110-119.

Eddy EM, O'Brien DA (1994) The Spermatozoon. En: *Physiology of Reproduction*. Editado por Knobil DJ, Neill JD, Raven Press, New York, pg.: 29-33.

Eng LA, Oliphant G (1978) Rabbit reversible decapacitation by membrane stabilization with a highly purified glycoprotein from plasma seminal. *Biol Reprod* 19: 1083-1094.

Flatmark T, Gronberg M, Huseby E Jr, Berg SV (1982) Inhibition of N-ethylmaleimide of the Mg-ATP driven proton pump of the chromaffin granules. *FEBS Lett* 149:71-74.

Fleming AD, Yanagimachi R (1982) Fertile life of the acrosome-reacted guinea pig spermatozoa. *J Exp Zool* 220: 109-115.

Fraser LR, Harrison RAP, Herod JE (1990) Characterization of a decapacitation factor associated with epididymal mouse spermatozoa. *J Reprod Fertil* 89: 135-137.

Fraser LR, Umar G, Sayed S (1993) Na^+ requiring mechanism modulate capacitation and acrosome exocytosis in mouse spermatozoa. *J. Reprod. Fertil* 97:539.

Garcia MA, Meizel (1999a) Regulation of intracellular pH in capacitated human spermatozoa by Na⁺/H⁺ exchanger. *Mol Repr Dev* 52: 189-195.

Garcia MA, Meizel (1999b) Progesterone-mediated calcium influx and acrosome reaction of human spermatozoa: pharmacological investigation of T-type calcium channels. *Biol Repr* 60: 102-109.

García R, Martínez R, Rábago M, Hernández-Pérez O, Reyes A, Rosado (1991) A subcellular distribution of phospholipase A2 and ATPases during capacitation and acrosome reaction in guinea pig spermatozoa. *Arch. Androl* 26:95-105.

Gatti JL, Chevrie C, Paquignon M, Dacheux JL (1993) External ionic conditions, internal pH and motility of ram and boar spermatozoa. *J Reprod Fertil* 98:439-449.

Gillies RJ, Martínez-Zaguilán R, Martínez GM, Serrano R, Perona R (1990) Tumorigenic 3T3 cells maintain an alkaline intracellular pH under physiological conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:7414-7418.

Gillies RJ, Martínez-Zaguilán R, Peterson EP, Perona R (1992) The role of intracellular pH in mammalian cell proliferation. *Cell Physiol Biochem* 2:159-179.
Gluck S (1992) V-ATPases of the plasma membrane. *J Exp Biol.* 172: 29-37.

Green CM, Cockie SM, Watson PF, Fraser LR (1994) Stimulating effect of pyroglutamylproline amide, a prostatic TRH-related tripeptide, on mouse sperm capacitation and fertilizing ability in vitro. *Mol Reprod Dev* 38:215-223.

Grinstein S, Rotin D, Mason MJ (1989) Na⁺/H⁺ exchange and growth factor inducing cytosolic pH changes. Role in cellular proliferation. *Biochim Biophys Acta* 988:73-97.

Han HL, Mack SR, DeJonge C, Zaneveld LJD (1990) Inhibition of the human sperm acrosome reaction by high molecular weight factor from human seminal plasma. *Fertil Steril* 6: 1177-1179.

Hernández-Pérez O, Rosado A (1988) Biología molecular del espermatozoide de humano. *Ciencia* 39: 249-260.

Hoskins DD, Vijayaraghavan S (1990) A new theory on the acquisition of sperm motility during epididymal transit. En: *Controls of sperm Motility Biological and Clinical Aspects*. Editado por Gagnon C. CRC press, Boca Raton, Florida, pg.: 53-62

Huacuja L, Delgado NM, Wans MA, Pedrón N, Rosado A (1981) Exchange of lipids between spermatozoa and seminal plasma in normal and pathological human semen. *Arch Androl* 7: 343-349.

Hyne RV, Garbers DL (1981) Requirement of serum factors for capacitation and the acrosome reaction of guinea pig spermatozoa in buffered medium below pH 7.8. *Biol Reprod* 24:257-266.

Hyne RV (1984) Bicarbonate- and sodium-dependent of rapid guinea-pig sperm acrosome reaction. *Biol Rev* 59: 125-157.

Hyne RV, Higginson RE, Kohlman RE, Lopata A (1984) Requirement for capacitation and membrane fusion during the guinea pig sperm acrosome reaction. *J Reprod Fertil* 70:83-94.

Kann ML, Serres C (1980) Development and initiation of sperm motility in the hamster epididymis. *Reprod Nutr Develop* 20 : 1739-1749.

Köhn FM, Mack SR, Schill WB, Zaneveld LJD (1997) Detection of human sperm acrosome reaction: comparison between methods using double staining, *Pisum sativum* agglutinin, concanavalin A and transmission electron microscopy. *Human Reprod* 12:714-721.

Kuzan FB, Fleming AD, Seidel GE (1984) Successful fertilization in vitro of fresh intact oocytes by perivitelline (acrosome reacted) spermatozoa of the rabbit. *Fertil Steril* 41: 766-770.

Larson JL, Miller DJ (1999) Simple histochemical stain for acrosome on sperm from several species. *Mol Reprod Dev* 52: 445-449.

Lee HC, Garbers DL, (1986) Modulation of the voltage-sensitive Na^+/K^+ exchange in sea urchin spermatozoa through membrane potential changes induced by the egg peptide speract. *J Biol Chem* 261:16026-16032.

Lee MA, Trucco GS., Bechtol KB, Wummer N, Kopf GS, Blasco L, Storey BT (1987) Capacitation and acrosome reaction in human spermatozoa monitored by chlortetracycline fluorescence assay. *Fertil Steril* 48:649-658.

Legault Y, Pleau G, Chapdelaine A, Roberts KD (1980) Steroid sulfatase activity of the hamster reproductive tract during the oestrous cycle. *Biol reprod* 23: 720-725.

Linares-Hernández, Guzman-Grenfell AM, Hicks-Gómez JJ, Gonzalez-Martínes MT (1998) Voltage-dependent calcium influx in human sperm assessed by simultaneous optical detection of intracellular calcium membrane potential. *Biochim Biophys Acta* 1372: 1-12.

Majumder GC, Dey CS, Haldar S, Barua M (1990) Biochemical parameters of initiation and regulation sperm motility. *Arch Androl* 24: 287-303.

Martínez-Zaguilán R, Lynch RM, Martínez GM, Gillies RJ (1993) Vacuolar type H(+) ATPases are functionally expressed in the plasma membrane of human tumor cells. *Am J Physiol (Cell Physiology)* 265:C1015-1029.

Meizel S, Dreamer DW (1978) The pH of the hamster sperm acrosome. *J Histochem Cytochem* 26:98-105.

Meizel S, Turner KO (1993) Initiation of human sperm acrosome reaction by Thapsigargin. *J Exp Zool* 267:350-355.

Mendoza C, Carreras A, Moos J, Tesarik J (1992) Distinction between true acrosome reaction and degenerative loss by one-step staining method using *Pisum sativum* agglutinin. *J Reprod Fertil* 85:755-763.

Mercado E, Dominguez R, Rosado A (1992) Changes in membrane fluidity during epididymal maturation of rabbit spermatozoa. A study with fluorescent probe diphenyl hexatriene. *Adv Cont Deliv Sist* 8: 253-255.

Miller D, Macek MB, Shur BD (1992) Complementarity between sperm surface β -1,4-galactosyl-transferase and egg-coat ZP3 mediates sperm-egg binding. *Nature* 352: 589-593.

Miller DJ, Gong X, Shur BD (1993) Sperm require β -N-acetylglucosaminidase to penetrate through the egg zona pellucida. *Development* 118: 11279-1289.

Moller CC, Bleil JD, Kinloch RA, Wassarman PM (1990) Structural and functional relationships between mouse and hamster zona pellucida glycoproteins. *Dev Biol* 137: 276-286.

Moolenaar WH (1986) Effects of growth factors on intracellular pH regulation. *Annu Rev Physiol* 48:363-376.

Moore HDM (1979) The net negative surface charge of mammalian spermatozoa as determined by isoelectric focusing. Changes following sperm maturation, ejaculation, incubation in the female tract, and after enzyme treatment. *Int J Androl* 2: 244-262.

Moore HDM, Hartman TD, Brown AC, Smith CA, Ellis DH (1985) Expression of sperm antigens during spermatogenesis and maturation detected with monoclonal antibodies. *Exp Clin Immunogenetics* 2: 84-96.

Morales P, Cross NL, Overstreet JW, Hanson FW (1989) Acrosome-intact and acrosome-reacted human sperm can initiate binding to the zona pellucida. *Dev Biol* 133: 385-392.

Nelson N (1991) Structure and pharmacology of the proton-ATPases. *Trends*

Pharmacol Sci 12:71-75.

Nelson N (1999) Vacuolar and plasma membrane proton-adenosinetriphosphatases. *Physiol Rev* 79:361-385.

Nowycky MC (1991) Distinguishing between multiple calcium channel types. En: *Molecular Neurobiology*. Editado por Chad J, Wheal H. The Practical Approach Series. Oxford University Press, New York, pg.: 28-31.

Pariset CC, Rousell C, Weimman SJ, Demaille JG (1985) Calmodulin intracellular concentration and cAMP-dependent-protein kinase activity in human sperm samples in relation to sperm morphology and motility. *Gamete Res* 8: 17-20.

Parrish JJ, Susko-Parrish J, Graham JK (1999) In vitro capacitation of bovine spermatozoa: role of intracellular calcium. *Theriogenology* 51: 461-472.

Peknicova J, Moos J, Mollova M, Srsen V, Capkova J (1994) Changes in immunochemical localization of acrosomal and sperm proteins in boar spermatozoa during capacitation and induced acrosome reaction. *Animal Reprod Sci* 35: 255-271.

Perona R, Serrano R (1988) Increased pH and tumorigenicity of fibroblasts expressing a yeast proton pump. *Nature* 334: 438-440.

Pholpramool C, Lea DA, Burrow PV, Dott HM, Setchell BP (1983) The effect of acidic epididymal glycoprotein (AEG) and some other proteins on the motility of rat epididymal spermatozoa. *Int J Androl* 6: 240-248.

Pietrobon D, DiVirgilio F, Pozzan T (1990) Structural and functional aspects of calcium homeostasis in eukaryotic cells. *Eur J Biochem* 193: 559-622.

Reddy JM, Audhya TK, Goodpasture JC, Zaneveld LJD. (1982) Properties of highly purified antifertility factor from human seminal plasma. *Biol Reprod* 27: 1076-1083.

Reyes A, Goicoechea B, Rosado A (1978) Calcium ion requirement for rabbit spermatozoal capacitation and enhancement of fertilizing ability by ionophore A23187 and cyclic adenosine 3':5'-monophosphate. *Fertil Steril* 29:451-455.

Reyes A, Mercado E, Goicochea B, Rosado A (1976) Participation of membrane sulfhydryl groups in the epididymal maturation of human and rabbit spermatozoa. *Fertil Steril* 12: 1452-1457.

Roldan ERS, Fleming AD (1989) Is a Ca^{2+} -ATPase involved in Ca^{2+} regulation during capacitation and acrosome reaction of guinea-pig spermatozoa? *J Reprod fertil* 85:297-308.

Roldan ERS, Harrison RAP (1990) Molecular mechanisms leading to exocytosis during sperm acrosome reaction. En: Fertilization in Mammals. Editado por Bavister BD, Cummins J, Roldan ERS. Serono Symposia. Norwel, Massachusetts, pg.: 179-222.

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

Rosado A (1988) Aspectos nuevos de viejas ideas sobre la capacitación y la reacción acrosomal. Arch Invest Med (Méx) 19: 253-264.

Ruffo GA, Schoff PK, Lardy HA (1984) regulation of calcium content in bovine spermatozoa. J Biol Chem 259: 2547-2552.

Sabeur K, Edwards PD, Meizel S (1996) Human sperm plasm membrane progesterone receptor(s) and acrosome reaction. Biol Reprod 54: 993-101.

Saling PM (1989) Mammalian sperm interaction with extracellular matrices of the egg. Oxfor Rev Reprod Biol 11: 339-388.

Saling PM, Sowinski J, Storey BT (1979) An ultrastructural study of epididymal mouse spermatozoa binding to zona pellucida in vitro: sequential relationship to acrosome reaction. J Exp Zool 209:229-238.

Saling PM y Lakoski KA (1985) Mouse sperm antigens that participate in fertilization II. Inhibition of sperm penetration throughout the zona pellucida using monoclonal antibodies. Biol Reprod 33: 527-536.

Santi A, Darszon A, Hernández-Cruz A (1996) A dihydroxypyridine-sensitive Ttype Ca^{2+} current carrier in mouse primary spermatocytes. Am J Physiol 271:C1583-C1593.

Schneider DL (1983) ATP-dependent acidification of membrane vesicles isolated from purified in rat liver lysosomes. Acidification activity required phosphate. J Biol Chem 258:1833-1838.

Shapiro BM, Schackmann RW, Tombes RM, Kazazoglou T (1985) Couple ionic and enzymatic regulation of sperm behavior. Curr Top Cell Regul 26:97-113.

Singer SL, Lambert H, Overstreet JW, Hanson FW, Yanagimachi R (1985) The kinetic of human sperm binding to the human zona pellucida and zona-free hamster oocyte in vitro. Gamete Res 12: 29.39.

Sokal RR, Rohlf FJ (1969) Biometry. Editado por WH Freeman y Co. San Francisco,

pg.: 299-342.

Spungin B, Breitbart H (1996) Calcium mobilization and influx during sperm exocytosis. *J Cell Biol* 109: 1947-1955.

Stone DK, Xie XS, Racker E (1983) An ATP-driven proton pump in clathrin coated vesicles. *J Biol Chem* 258:4059-4062.

Suárez SS, Wolf DP, Meizel S (1986) Induction of the acrosome reaction in human spermatozoa by a fraction of human follicular fluid. *Gamete Res* 4:407- 432

Sullivan R, Ross P, Berubé B (1989) Immunodetectable galactosyltransferase is associated only with human spermatozoa of high buoyant density. *Biochem Biophys Res Commun* 162: 184-188.

Suzuki F (1990) Morphological aspects of sperm maturation: modification of the sperm plasma membrane during epididymal transport. En: *Fertilization in Mammals*. Editado por Bavister BD, Cummins J, Roldan ERS. Serono Symposia, USA. Newton, Massachussets, pg.: 65-75.

Tampaichitr N, Hansen C (1994) Production of motile acrosome-reacted mouse sperm with nanomolar concentration of calcium ionophore A23187. *Mol. Reprod. Dev* 37:326.

Tezarik J Moos J, Mendoza C (1993) Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by a progesterone receptor on the cell surface of human sperm. *Endocrinology* 133: 328-335.

Tesarik J (1986) From the cell, to the molecular dimension: the actual challenge for human fertilization research. *Gamete Res* 13: 47-89.

Trejo R, Mújica A (1990) Changes in calmodulin compartmentalization throughout capacitation and acrosome reaction in guinea pig spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 26: 366-376.

Tulsiani DRP, Skudarek MD, Orgebin-Crist MC (1990) Human sperm plasma membranes possess a D-mannosidase activity but no galactosyltransferase activity. *Biol Reprod* 42: 843-858.

Turrini F, Sabolic I, Zimolo Z, Moewes B, Burckhardt G (1989) Relation of ATPases in rat renal brush-border membranes to ATP-driven H⁺. *J Memb Biol* 107: 1-12.

Uguz C, Vredenburg WL, Parrish JJ (1994) Heparin induced capacitation but not intracellular alkalinization of bovine sperm is inhibited by Rp-adenosine-3', 5'-cyclic

monophosphorothioate. Biol Reprod 51:1031-1039.

Vredenburgh-Wilberg WL, Parrish JJ (1995) Intracellular pH of bovine sperm increases during capacitation. Mol Reprod Dev 40:490-502.

Ward CR, Kopf GS (1993) Molecular events mediating sperm activation. Dev Biol 158: 9-34.

Wassarman PM (1988). Zona pellucida glycoproteins. Annu Rev Biochem 57:415-442.

White DR, Aitken JR (1989) Relationship between calcium, cyclic AMP, ATP and intracellular pH and capacity of hamster spermatozoa to express hyperactivated motility. Gamete Res 22: 163-166.

Wong PYD, Lee WM, Tsang AYW (1981) The effects of extracellular sodium on acid release and motility initiation in rat caudal epididymal spermatozoa in vitro. Exp Cell Res 131:97-104.

Working PK, Meizel S (1982) Preliminary characterization of a Mg^{2+} -ATPase in hamster head membranes. Biochem Biophys Commun 104:1060-1065.

Working PK, Meizel S (1983) Correlation of increased intraacrosomal pH with the hamster sperm acrosome reaction. J Exp Zool 227:97-107.

Yanagimachi R (1981) Mechanisms of Fertilization in Mammals. En: Fertilization and Embryonic Development *in vitro*. Editado por Mastroianni L, Biggers JD. Plenum Press. New York, pg.: 81-84.

Yanagimachi R (1994) Mammalian Fertilization. En: The Physiology of Reproduction. Editado por Knobil E, Neil JD, 2a. edición. Raven Press LTD. New York, pg.: 189-317.

Zeng Y, Clark EN (1995) Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal reaction Dev Biol 171:554-563.

Zeng Y, Oberdorf JA, Florman M (1996) pH regulation in mouse sperm: Identification of Na^+ , Cl^- , and HCO_3^- dependent and arylaminobenzoate-dependent regulatory mechanisms and characterization of their roles in sperm capacitation. Dev Biol 173: 510-520.

X.- DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS.

Prof. Dr. G. Aumüller

Department of Anatomy and Cell Biology, Robert-Koch-Str. 6, D-35033 Marburg

Rebeca García Macedo, M.Sc.
Coordinación de Investigación Médica
Unidad de Investigación Médica en Bioquímica
Hospital de Especialidades C.M.N.S.XXI
Instituto Mexicano del Seguro Social.
Av. Cuauhtémoc 330, Col Doctores
MÉXICO D.F. 06725, México

Editors-in-Chief:

Prof. Dr. Dr. W.-B. Schill
Center of Dermatology and Andrology
Gaffkyst. 14, D-35385 Giessen
Phone: (+49) 641-99-43-200
Fax: (+49) 641-99-43-209

Prof. Dr. G. Aumüller
Department of Anatomy and Cell Biology
Robert-Koch-Str. 6, D-35033 Marburg
Phone: (+49) 6421-286-6245
Fax: (+49) 6421-286-8983

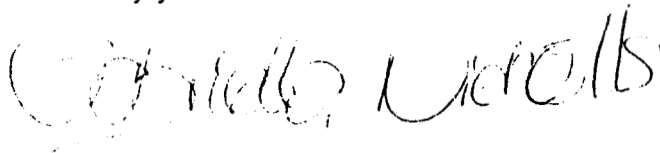
14.06.00

Re: Ms. 00GA-01: Effect of Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar (V-Type) proton ATPases, on the capacitation of rabbit spermatozoa / R Garcia-Macedo, AM Rosales, O Hernández-Pérez, ME Chavarria, A Reyes and A Rosado

Dear Dr. Garcia Macedo,

We are pleased to inform you that the revised version of the above mentioned manuscript has now been accepted, and has been sent to our publishers for publication in our journal, ANDROLOGIA.

Sincerely yours



Gabriella Nicholls

Editorial Office

Prof. Dr. G. Aumüller

**Effect of Bafilomycin A1, a Specific Inhibitor of Vacuolar
(V-Type) Proton ATPases, on the Capacitation of Rabbit
Spermatozoa**

**R. García-Macedo¹, A. M. Rosales², O. Hernández-Pérez³, M.E. Chavarría⁴,
A. Reyes⁴ and A. Rosado³**

¹ Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Hospital de Especialidades CMN Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México, D. F.; ² Departamento de Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, México, D. F.; ³ Departamento de Biología de la Reproducción, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, México, D. F.; ⁴ Unidad de Investigación Médica en Medicina Reproductiva, Hospital de Gineco-Obstetricia "Luis Castelazo Ayala", Instituto Mexicano del Seguro Social, México, D. F.

Short Title: Proton ATPases and Sperm Capacitation

Keywords: V-type H⁺-ATPase-capacitation-acrosome reaction-rabbit spermatozoa-bafilomycin.

Correspondence Address: Rebeca García Macedo, M.Sc. Coordinación de Investigación Médica. Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Hospital de Especialidades, C.M.N.S. XXI. Instituto Mexicano del Seguro Social. Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, México D.F. 06725, México. Fax (52)57612358. E-mail: gamareb@yahoo.es

Summary.

Mammalian spermatozoa maintain precisely regulated ionic gradients that must be modified during capacitation and the acrosomal reaction. In other cell types, ionic gradients are mainly regulated by the presence in plasma membranes of three metabolically different types of ATPases. The modifications induced during *in vitro* capacitation of rabbit spermatozoa by the specific inhibition of V-type H^+ -ATPases with bafilomycin A were studied. We used chlortetracycline binding to rabbit spermatozoa to monitor capacitation, and the coomassie brilliant blue method to identify acrosome-reacted sperm cells. There was a significant difference between the percentage of epididymal ($66\pm 7\%$) and of ejaculated ($43\pm 11\%$) spermatozoa capacitated *in vitro*, after a 6 h incubation period in the presence of Ca^{2+} without ATPase inhibitor. Presence of bafilomycin significantly reduced these numbers ($25\pm 11\%$ and $16\pm 8\%$, epididymal and ejaculated spermatozoa, respectively) and eliminated the difference. Ejaculated spermatozoa capacitated in the absence of bafilomycin showed a linear increase in the percentage of acrosomal reactions induced by addition of A23187 (12 ± 5 ; 23 ± 6 , 31 ± 5 ; after 15, 30 and 45 min). Presence of $0.2 \mu\text{mol l}^{-1}$ bafilomycin during the capacitation incubation induced a significant decrease in the acrosome reaction percentages (4 ± 2 , 8 ± 3 , 14 ± 4 ; after 15, 30 and 45 min). Addition of bafilomycin after the capacitating period had no effect upon the induction of the acrosomal reaction by A23187. These results indicate that vacuolar ATPases play an important role during rabbit sperm capacitation; however, once the sperm has been capacitated V-Type ATPases do not have a significant participation during the acrosomal reaction.

Introduction

Despite decades of *in vivo* and *in vitro* investigation, the molecular nature of the biochemical processes that participate in capacitation of mammalian spermatozoa are not yet fully understood. It has been consistently shown that precise modifications in the equilibrium between the $cell_{in}$ / $cell_{out}$ ionic concentrations are required for the occurrence of the acrosome reaction. However, little is known about the requirement for these types of changes during capacitation, and many of the described changes remain controversial. Like any other cell, mammalian spermatozoa must maintain precisely regulated ionic gradients across their membrane structures, particularly across the plasma membrane. Many of these ionic gradients are regulated by the presence of specific ATPases, enzymes that depend upon the metabolism of ATP for their activity. To date most ion pumping ATPases have been included in one of three principal types of enzymes: (1) F-type ATPases; although exhibiting ATPase activity, they are usually involved in ATP synthesis. (2) P-type ATPases; these enzymes induce electroneutral translocation of cations, particularly H^+ , Na^+ , K^+ , and Ca^{2+} , are specifically inhibited by vanadate, and, in the case of the Na^+ , K^+ -ATPase, by ouabain. (3) V-type, vacuolar ATPases; a recently described type of these enzymes. Although they were initially related to pH modifications of intracellular compartments, they also function as an efficient plasma membrane proton pump, generating protonmotive gradients that might be reflected in changes of the intra- (Gillies *et al.*, 1992; Martínez-Zaguilán *et al.*, 1993) and extra-cellular pH (Breton *et al.*, 1996). V-type H^+ -ATPases are not inhibited by vanadate or ouabain, but are

specifically inhibited by the macrolide antibiotic bafilomycin A1 (Bowman *et al.*, 1988).

Because sperm cells maintain a relatively low resting pH (Babcock *et al.*, 1983; Gatti *et al.*, 1993; Zeng *et al.*, 1996), and because capacitation is associated with alkaline shifts in the intracellular pH of spermatozoa (Hyne & Garbers, 1981; Working & Meizel, 1983; Vredenburg-Wilberg & Parrish, 1995; Zeng *et al.*, 1996), we hypothesized that mammalian spermatozoa might express V-type ATPases in their plasma membranes. The presence of these ATPases in the sperm plasma membrane might help to explain the reported differences in the mechanism(s) controlling pH_i in mammalian spermatozoa. In effect, two specific properties make the regulation of intracellular pH unique to mammalian and, perhaps, invertebrate spermatozoa: *i*) cytosolic alkalinization in rat (Wong *et al.*, 1981) and guinea pig (Hyne *et al.*, 1984) spermatozoa is not sensible to the action of amiloride, an inhibitor of the Na^+/H^+ antiport which is usually associated with increases in intracellular pH in somatic cells (Grinstein *et al.*, 1989); *ii*) alkalinization of both mammalian (Babcock & Pfeiffer, 1987) and invertebrate (Lee & Garbers, 1986) sperm cells seems to be strictly related to changes in membrane voltage, while regulation of pH_i in somatic cells is commonly related to the activity of an electroneutral Na^+/H^+ exchanger (Babcock & Pfeiffer, 1987; Grinstein *et al.*, 1989; Martínez-Zaguilán *et al.*, 1993).

To improve the understanding about the molecular changes occurring during capacitation, we decided to study: a) if electrogenic (V-type)- H^+ -ATPases are expressed in the mammalian spermatozoa plasma membrane; b) if this type of H^+ -ATPases contribute to the modifications of the intra-cellular pH occurring during

capacitation, comparing its activity in epididymal and ejaculated spermatozoa; and c) if they participate in the mechanism(s) regulating the development of the acrosomal reaction induced by the calcium ionophore A23187. For these studies we used the rabbit as our animal model, because this is one of the few species in which capacitation can be studied in both epididymal and ejaculated spermatozoa obtained from the same individual. Our results indicated that vacuolar ATPases play an important role during rabbit sperm capacitation. Once the sperm cell has been capacitated, V-Type ATPases play a non-significant role during the acrosomal reaction.

Materials and methods

Chemicals and Reagents

Chlortetracycline (CTC), fluorescein isothiocyanate-*Pisum sativum* agglutinin complex (FITC-PSA), Coomassie brilliant blue G-250, HEPES (N-(2-hydroxy-ethyl) piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)), sodium pyruvate, Tris (tris-(hydroxymethyl) aminomethane), sodium lactate, D-(+) glucose, Percoll, bovine serum albumin (fatty acids free), bafilomycin A1, poly-L-lysine, ammonium acetate and other salts were purchased from Sigma Chemical Co (St. Louis, Missouri, USA); calcium ionophore A23187 was purchased from Boehringer-Mannheim (Germany). All other reagents were analytical grade or better.

Stock solutions of bafilomycin A1 and A23187 were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO), stored and checked as indicated by Bowman *et al.* (1988) and by Köhn *et al.* (1997), respectively. The final concentration of DMSO in the assay mixtures never exceeded 0.5%, and the indicated control samples without bafilomycin or A23187 contained the appropriate concentrations of DMSO.

The incubation media used were: medium A (30 mmol l⁻¹ HEPES, 5 mmol l⁻¹ KCl, 100 mmol l⁻¹ NaCl, 21 mmol l⁻¹ sodium lactate, 2.5 mmol l⁻¹ sodium pyruvate, all adjusted to pH 7.6); enriched medium A (30 mmol l⁻¹ HEPES, 5 mmol l⁻¹ KCl, 100 mmol l⁻¹ NaCl, 21 mmol l⁻¹ sodium lactate, 2.5 mmol l⁻¹ sodium pyruvate, 13.9 mmol l⁻¹ glucose, 1 mg ml⁻¹ fatty acids-free bovine serum albumin, all adjusted to pH 7.6); capacitating medium A (30 mmol l⁻¹ HEPES, 5 mmol l⁻¹ KCl, 100 mmol l⁻¹ NaCl, 21 mmol l⁻¹ sodium lactate, 2.5 mmol l⁻¹ sodium pyruvate, 13.9 mmol l⁻¹ glucose, 1 mg ml⁻¹ fatty acids-free bovine serum albumin, 2.5 mmol l⁻¹ CaCl₂, all adjusted to pH

7.6; PBS-Medium (200 mmol l⁻¹ NaCl, 2.7 mmol l⁻¹ KCl, 8 mmol l⁻¹ Na₂HPO₄, 1.5 mmol l⁻¹ KH₂PO₄, 50 % glycerol (v/v) (Miller et al., 1993).

Biological material

Mature New Zealand white rabbits of proven fertility, 10 to 15 months old and weighing 3.5 to 4.5 kg were used. Male rabbits were ejaculated twice a week and those with consistently good ejaculates selected for the experiments. Six days after the last ejaculation, rabbits were sacrificed and cauda epididymal spermatozoa were obtained by 3 ml medium A perfusion of the cauda epididymus through the deferent duct. To increase the percentage of motile cells, ejaculated and epididymal sperm suspensions were centrifuged, 900xg for 20 min, through a two-phase Percoll gradient (95% and 75% Percoll diluted in Medium A) (Suárez *et al.*, 1986). The spermatozoa were recovered and washed by centrifugation at 500xg for 5 min, and finally counted and suspended in either enriched medium A (controls) or in capacitating medium A to a final concentration of 2.5×10^7 sperm cells ml⁻¹.

Procedures

Resuspended ejaculated or epididymal sperm cells were divided into 0.5 ml aliquots, and added to 1.5 ml microtubes containing: (a) 100 µl of the indicated dilution medium (controls); or (b) 100 µl of the appropriate solution of bafilomycin A1 to reach the desired final concentration of 0.2 µmol l⁻¹ (Bowman *et al.*, 1988). Sperm suspensions were then incubated for 6 h at 37°C with mild shaking in loosely capped polypropylene conical centrifuge tubes under a 5% CO₂/ 95% air atmosphere. At the end of the capacitating period, 25 µl duplicated aliquots of the sperm cell suspensions

were used to determine viability using the eosin/nigrosin method, and motility by direct microscopic observation. Duplicated aliquots of the sperm cell suspensions (25 μ l) were used also to evaluate the percentage of capacitated spermatozoa by the chlortetracycline (CTC) binding method (Green *et al.*, 1994).

Each remaining of the cell suspensions was divided into two aliquots. Two of these aliquots, one control and one experimental, were directly used to induce the acrosomal reaction as described below. In this way, capacitation and acrosomal reaction in the total absence of inhibitor, as well as capacitation and acrosomal reaction under the continuous presence of bafilomycin A1 were studied. The other two aliquots, one control and one experimental, were washed twice by centrifugation at 500xg for 5 min, to free the experimental tubes of ATPase inhibitor, and finally resuspended in 200 μ l of capacitating medium A.

To study the effect of bafilomycin A1 upon the acrosomal reaction in control spermatozoa, i.e. capacitated in the absence of the ATPase inhibitor, 50 μ l of the appropriate solution of bafilomycin A1 were added, to reach the desired final concentration of 0.2 μ mol l⁻¹, to the control washed and resuspended spermatozoa. Finally, to study the occurrence of the acrosome reaction in the absence of bafilomycin A1, but in sperm cells capacitated in the presence of the inhibitor, 50 μ l of the appropriate media were added to the washed, bafilomycin-free, experimental sperm suspension. In the case of epididymal spermatozoa we decided to study only the differences induced by the presence of bafilomycin during the capacitating period.

The acrosome reaction was induced, in all cases, by the addition of 100 μl of the A23187 diluted stock solution to reach a final concentration of 10 $\mu\text{mol l}^{-1}$ of the ionophore, and the incubation was continued under the same conditions. After 15, 30 and 45 min at 37°C, the percentage of acrosome reacted spermatozoa was determined by the CBB (Miller *et al.*, 1993) and by the FITC-PSA methods (Cross & Meizel, 1989).

Evaluation of the percentage of capacitated sperm.

After the 6 h capacitating time, a 50 μl aliquot of the sperm suspension was mixed with 50 μl of a recently prepared CTC solution (750 $\mu\text{mol l}^{-1}$ CTC, 130 mmol l^{-1} NaCl, 5 mmol l^{-1} cysteine, 20 mmol l^{-1} Tris-Cl, pH 7.8) after 10 seconds incubation 10 μl of 12% paraformaldehyde solution in 0.5 mol l^{-1} Tris, pH 7.4 were added (Green *et al.*, 1994). Ten microliters of this mixture were smeared on a warmed (37°C) glass slide covered with a solution of the antioxidant 1,4-diazabicyclo-(2,2,2)-octane (DABCO) (0.22 mol l^{-1}) in 90% glycerol to prevent photobleaching (Köhn *et al.*, 1997), and immediately observed by epifluorescence using a Zeiss microscope with a 2Fl filter (405 nm excitation, 460 nm fluorescence and 510 nm barrier filters). At least 200 spermatozoa per experimental condition were counted and classified according to the fluorescence pattern of their heads.

In vitro fertilization.

To further assess capacitation of spermatozoa, control sperm cells were added to an in vitro fertilization system, following the method of Brackett & Oliphant (1975). Superovulated adult New Zealand White does were used as ova donors, 16 h after an

i.v. injection of HCG (75 UI). Ova were recovered in a plastic petri dish (Falcon Plastics, Oxnard, CA) by flushing the oviducts under mineral oil with Brackett's medium containing 20% rabbit heated blood serum. Sperm and eggs were incubated together for 28-30 h at 37°C under a 5% CO₂, 95% air atmosphere. Eggs were examined for fertilization under a phase contrast microscope as previously described (Reyes *et al.*, 1978).

Pisum sativum agglutinin assessment of acrosomal reaction.

This procedure was performed following the method of Mendoza *et al.* (1992), as modified by Köhn *et al.* (1997). After incubation in the presence of A23187 the sperm cells were washed twice in medium A (500xg, 5 min); 100 µl of the resuspended spermatozoa were smeared on glass slides and air-dried. After permeabilization by 10 min immersion in 100% methanol, the smears were covered with 100 µl of a solution of FITC-PSA (150 µg ml⁻¹ PBS, pH 7.4) and incubated for 30 min at room temperature in a moisture chamber. The slides were washed with distilled water, air dried, mounted and treated for 15 min with a solution of the antioxidant DABCO to prevent photobleaching (Köhn *et al.*, 1997) and immediately observed by epifluorescence using a Zeiss microscope with a 2Fl filter (405 nm excitation, 460 nm fluorescence and 510 nm barrier filters).

Evaluation of the acrosomal reaction by the coomassie brilliant blue method.

One hundred microliters aliquots of A23187-incubated spermatozoa were fixed by 10 min incubation with 4% v/v paraformaldehyde prepared in 0.5 mol l⁻¹ Tris-HCl pH 7.4. The fixed sperm cells were washed twice with 1:3 v/v 0.1 mol l⁻¹ ammonium acetate (1200xg 10 min). The precipitated fixed spermatozoa were resuspended in 25

μ l ammonium acetate solution, smeared on a polylysine-coated glass slide and air-dried. The smears were stained by incubation for 1.5 h in a solution of CBB G-250 prepared in 50% methanol and 10% acetic acid. The stained slides were washed with 0.1 mol l⁻¹ ammonium acetate, covered with PBS-glycerol 50% (v/v) (Miller *et al.*, 1993), observed and counted under high power magnification using a Zeiss microscope.

All tests depending on microscopically counted sperm samples were done following double blind procedures and checked by two independent observers, each counting at least 200 spermatozoa on each observed slide (Meizel & Turner, 1993). In all cases after classification of at least 200 spermatozoa per slide according to the fluorescence or staining patterns of their acrosomes, the percentage of the capacitated or acrosome-reacted spermatozoa was calculated.

Statistics.

Statistical analyses were done using the SigmaStat v2.0 package (Sigma-Aldrich Co., San Louis, Missouri, USA). AR percentages were transformed to the arcsines of their square roots (Sokal & Rohlf, 1981) and the transformed data analyzed by two ways ANOVA and two-tailed Dunnet t-test. F values corresponding to $p < 0.05$ were considered significantly different.

Results

Chlortetracycline fluorescence in rabbit spermatozoa followed a pattern similar to that described for human spermatozoa (Cross & Meizel, 1989; Lee *et al.*, 1987).

Control spermatozoa, incubated in Ca^{2+} free medium (enriched medium A), were scarcely fluorescent (Fig. 1a). Capacitated spermatozoa were brightly fluorescent, particularly on the anterior, acrosomal region (Fig. 1b). A pattern of spermatozoa showing a bright band of fluorescence around the sperm head (Lee *et al.*, 1987) was observed only at the end of the capacitating period (Fig. 1c, arrows).

Sperm capacitation in control cells was initially assessed by means of *in vitro* fertilization (Table 1). These results indicated a linear increase in the number of fertilized eggs during the first six hours of incubation. The results obtained after the 8 h incubation period were not different from those obtained with a 6 h incubation, therefore we decided to use this time as the capacitation period.

There was a significant difference ($p < 0.05$) between the percentage of epididymal ($66 \pm 7\%$) and ejaculated ($43 \pm 11\%$) spermatozoa that were capacitated *in vitro* in the absence of bafilomycin A1. Addition of the H^+ -ATPase inhibitor to the capacitation medium reduced these numbers more than 50% (Table 2).

The motility and the percentage of live epididymal and ejaculated spermatozoa were not significantly different between controls and test samples, after the 6 h incubation under capacitating conditions. According with the results of Köhn *et al.* (1997) in human spermatozoa, we found that after 45 min of incubation with $10 \mu\text{mol l}^{-1}$ A23187, the percentage of motile and viable rabbit spermatozoa decreased drastically. Therefore, our acrosome reaction studies included only 15, 30 and 45 min incubations.

Acrosome-reacted rabbit spermatozoa could be precisely identified by both the CBB (Fig 2a) and the FITC-PSA methods (Fig. 2b). In the case of CBB, blue staining of

the acrosomal region, forming a distinct apical ridge, indicated intact acrosomes of unreacted spermatozoa. Lack of blue staining was interpreted as characteristic of acrosomal-reacted spermatozoa (Fig. 2a, arrows). In the case of FITC-PSA, unreacted spermatozoa showed bright fluorescence of the anterior half of the sperm head. No fluorescence or only a band of fluorescence in the equatorial region indicated loss of the acrosomal membranes during the acrosomal reaction (Fig. 2b, arrows). In control groups, capacitated in the absence of ATPase inhibitor, no significant differences were found at any of the three times studied, between the percentage of A23187 treated, acrosome reacted spermatozoa stained with FITC-PSA (12 ± 4 , 23 ± 6 and 31 ± 7 , at 15, 30 and 45 min; $n=7$) and those stained with CBB (14 ± 5 , 24 ± 5 and 29 ± 6 , $n=9$). Therefore in the remaining experiments the percentage of acrosome reacted spermatozoa was measured only with CBB.

After 6 h of capacitation in the absence of bafilomycin A1 and treatment with A23187 for 15, 30 and 45 min, both epididymal and ejaculated spermatozoa showed an almost linear increase in the percentage of acrosome reaction (Table 3). In the presence of bafilomycin A1 there was a notable decrease in the percentage of acrosome-reacted sperm cells at all the studied times (Table 3). Under control conditions there is a substantial difference between the number of epididymal spermatozoa that capacitate and the number of spermatozoa that are induced to experiment the acrosome reaction after 45 min incubation in the presence of A23187 (Tables 2 and 3). This difference is not so clear in the case of ejaculated spermatozoa. All the percentages of acrosome reacted spermatozoa were corrected by subtracting the percentage of spontaneously reacted sperm cells ($<6\%$).

Figure 3 shows the presence of a linear increase in the percentage of A23187 treated, acrosome-reacted spermatozoa, after capacitation in the absence of bafilomycin A1. Presence of $0.2 \mu\text{mol l}^{-1}$ bafilomycin A1 during the capacitating period induced a significant decrease in the percentage of spermatozoa that experienced the acrosomal reaction after the addition of the ionophore. When bafilomycin A1 was continuously present during capacitation and during the stimulation of the acrosome reaction with A23187, the percentages of acrosome-reacted spermatozoa were similar to those produced by the presence of bafilomycin during capacitation only. Finally, when bafilomycin was present only during the time in which spermatozoa were incubated with A23187, the presence of this ATPase inhibitor had no effect upon the induction of the acrosomal reaction by the ionophore.

Discussion

We found that the percentage of rabbit spermatozoa with acrosomal loss can be adequately measured either with FITC-PSA or by staining with CBB. Because slides evaluation was easier with the CBB method we decided to use it instead of the FITC-PSA staining (Cross & Meizel, 1989; Yanagimachi, 1994). After 6 h capacitation followed by incubation with $10 \mu\text{mol l}^{-1}$ A23187, both the percentages of acrosome reacted sperm cells and the time course of the process in rabbit spermatozoa, were completely comparable with data reported previously by us (Reyes *et al.*, 1978) and with data reported in other animal species (Working & Meizel, 1983; Cross *et al.*, 1989; Miller *et al.*, 1993; Uguz *et al.*, 1994; Köhn *et al.*, 1997).

Many reports support the idea that, *in vitro*, epididymal spermatozoa are more capable of fertilizing eggs than ejaculated sperm cells (Yanagimachi, 1994). This difference has been ascribed to the adsorption or binding during ejaculation, of some components from the seminal plasma that might give a higher degree of stabilization to the sperm plasma membrane (Yanagimachi, 1994). Our results showed that under control conditions a significantly higher percentage of epididymal spermatozoa, as compared to ejaculated spermatozoa, were capacitated during the 6 h incubation period ($66 \pm 7\%$ vs $43 \pm 11\%$, respectively). This difference between epididymal and ejaculated spermatozoa subsisted during the development of the acrosomal reaction. Interestingly, these differences were eliminated by the inclusion of bafilomycin in the capacitating media, suggesting that the variations between epididymal and ejaculated spermatozoa might be biochemical as well as structural.

Hyperactivation of capacitating spermatozoa demands a tremendous burst on metabolic activity and may have a dramatic effect on intracellular pH, inducing a significant acidification of the cell cytoplasm. However, sperm capacitation seems to be associated with important raises in intracellular pH (Meizel & Dreamer, 1978; Working & Meizel, 1983; Uguz *et al.*, 1994; Vredenburg & Parrish, 1995; Zeng *et al.*, 1996). Regulation of intracellular pH in mammalian cells is done through the collaborative function of three metabolic processes: Na^+/H^+ exchange (Boron, 1986; Moolenaar, 1986), HCO_3^- transport (Gillies *et al.*, 1992) and the recently demonstrated presence of H^+ -ATPases (P-type or V-type ATPases) in the cell plasma membrane (Turrini *et al.*, 1989; Nelson, 1991; Martínez-Zaguilán *et al.*, 1993; Breton *et al.*, 1996).

Cells that have a high metabolic activity may depend on the expression of plasma membrane V-type ATPases to maintain a high pH_{in} (Gillies *et al.*, 1990; Perona & Serrano, 1988). Martínez-Zaguilán *et al.* (1993) found that incubation of human tumor cells in the presence of bafilomycin A1 prevented the alkalinization related to metabolic activity, inducing a significant concentration-dependent decrease in the pH_{in} in 6 tumor cell lines. It is then possible that a similar phenomenon could be occurring in rabbit spermatozoa, because addition of bafilomycin A1 to a suspension of epididymal or ejaculated sperm cells significantly decreased the capacitation percentage after a 6 h incubation period. Since bafilomycin A1 is a highly specific inhibitor of V-type H^+ -ATPases (Bowman *et al.*, 1988), our results indicate that rabbit, and perhaps other mammalian spermatozoa, express a plasma membrane

located H^+ -ATPase whose activity might be necessary to insure the cytoplasmic alkalization that accompanies capacitation.

The importance of the participation of V-type ATPases in the capacitation process may be indirectly supported by the following facts: (i) cytoplasmic alkalization of sperm cells may occur in the almost complete absence of HCO_3^- (Gatti *et al.*, 1993); (ii) the Na^+ / H^+ exchanger activity decreases as pH increases, becoming almost inactive at pH_{in} values >7.25 (Moolenaar, 1986), making it an inefficient regulator of intracytoplasmic alkalization.

Our studies were performed to determine if H^+ -ATPases are localized in the spermatozoa plasma membrane, and whether they play a function in the regulation of the pH_{in} during capacitation. However, it was also important to define whether vacuolar ATPases participate in the regulation of the intra-acrosomal pH during the stimulation of the acrosomal reaction by A23187. Working & Meizel (1983) reported that a notable Ca^{2+} - independent elevation of intra-acrosomal pH occurs in hamster sperm previously to the occurrence of the acrosome reaction. This notable change requires the presence of high concentrations of K^+ . Vacuolar ATPases were originally described in the membranes of intracellular organella, including endosomes and lysosomes, playing a significant role in the maintenance of the acidic pH required for their adequate function (Bowman *et al.*, 1988). It is therefore interesting that once rabbit spermatozoa have been capacitated, bafilomycin A1 did not interfere with the occurrence of the acrosomal reaction, indicating that bafilomycin activity during capacitation is due to its interaction with proton ATPases located in the plasma

membrane (Martínez-Zaguilán *et al.*, 1993) and that intra-acrosomal pH must be regulated by different biochemical mechanisms.

Our results also suggest that the presence of membrane V-type ATPases in mammalian spermatozoa might explain some of the observed changes in intracellular pH that accompany acquisition and control of motility in these cells (Babcock *et al.*, 1983; Carr *et al.*, 1985; Carr & Acott, 1989; Gatti *et al.*, 1993).. Further experiments that are aimed at demonstrating the importance of these enzymes in other mammalian spermatozoa and under other experimental conditions, such as the initiation of motility in ejaculated spermatozoa, are now in progress.

Acknowledgements. Support for this project was provided in part by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT (No. 0699P-M9506).

References

Babcock DF, Rufo GA, Lardy HA (1983) Potassium-dependent increases in cytosolic pH stimulate metabolism and motility of mammalian sperm. Proc Natl Acad Sci USA 50:1327-1331.

Babcock DF, Pfeiffer DR (1987) Independent elevation of cytosolic $[Ca^{2+}]$ and pH of mammalian sperm by voltage-dependent and pH-sensitive mechanisms. J Biol Chem 262:15041-15047.

Boron WF (1986) Intracellular pH regulation in epithelial cells. Ann Rev Physiol 43:377-388.

Bowman EJ, Siebers A, Altendorf K (1988) Bafilomycins: A class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. Proc Natl Acad Sci USA 85:7972-7976.

Brackett BG, Oliphant G (1975) Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. Biol Reprod 12:260-274.

Breton S, Smith PJ, Lui B, Brown D (1996) Acidification of the male reproductive tract by a proton pumping (H^+)-ATPase. Nat Med 2:470-472.

Carr DW, Acott TS (1989) Intracellular pH regulates bovine sperm motility and protein phosphorylation. Biol Reprod 41:907-920.

Carr DW, Usselman MC, Acott TS (1985) Effect of pH lactate and viscoelastic drag on sperm motility: a species comparison. *Biol Reprod* 30:913-925.

Cross NL, Meizel S (1989) Methods of evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biol Reprod* 41:635-641.

Cross NL, Morales P, Fukuda M, Behboodi E (1989) Determining acrosomal status of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) sperm by fluorescence microscopy. *Am J Primatology* 17:157-163.

Gatti JL, Chevie C, Paquignon M, Dacheux JL (1993) External ionic conditions, internal pH and motility of ram and boar spermatozoa. *J Reprod Fertil* 98:439-449.

Gillies RJ, Martínez-Zaguilán R, Martínez GM, Serrano R, Perona R (1990) Tumorigenic 3T3 cells maintain an alkaline intracellular pH under physiological conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:7414-7418.

Gillies RJ, Martínez-Zaguilán R, Peterson EP, Perona R (1992) The role of intracellular pH in mammalian cell proliferation. *Cell Physiol Biochem* 2:159-179.

Green CM, Cockie SM, Watson PF, Fraser LR (1994) Stimulating effect of pyroglutamylproline amide, a prostatic TRH-related tripeptide, on mouse sperm capacitation and fertilizing ability in vitro. *Mol Reprod Dev* 38:215-223.

Grinstein S, Rotin D, Mason MJ (1989) Na⁺/H⁺ exchange and growth factor inducing cytosolic pH changes. Role in cellular proliferation. *Biochim Biophys Acta* 988:73-97.

Hyne RV, Garbers DL (1981) Requirement of serum factors for capacitation and the acrosome reaction of guinea pig spermatozoa in buffered medium below pH 7.8. *Biol Reprod* 24:257-266.

Hyne RV, Higginson RE, Kohlman RE, Lopata A (1984) Requirement for capacitation and membrane fusion during the guinea pig sperm acrosome reaction. *J Reprod Fertil* 70:83-94.

Köhn FM, Mack SR, Schill WB, Zaneveld LJD (1997) Detection of human sperm acrosome reaction: comparison between methods using double staining, *Pisum sativum* agglutinin, concanavalin A and transmission electron microscopy. *Human Reprod* 12:714-721.

Lee HC, Garbers DL, (1986) Modulation of the voltage-sensitive Na^+/K^+ exchange in sea urchin spermatozoa through membrane potential changes induced by the egg peptide speract. *J Biol Chem* 261:16026-16032.

Lee MA, Trucco GS., Bechtol KB, Wummer N, Kopf GS, Blasco L, Storey BT (1987) Capacitation and acrosome reaction in human spermatozoa monitored by chlortetracycline fluorescence assay. *Fertil Steril* 48:649-658.

Martínez-Zaguilán R, Lynch RM, Martínez GM, Gillies RJ (1993) Vacuolar type H(+) ATPases are functionally expressed in the plasma membrane of human tumor cells. *Am J Physiol (Cell Physiology)* 265:C1015-1029.

Mazia D, Schatten G, Sale W (1975) Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. *J Cell Biol* 66:198-200.

Meizel S, Dreamer DW (1978) The pH of the hamster sperm acrosome. *J Histochem Cytochem* 26:98-105.

Meizel S, Turner KO (1993) Initiation of human sperm acrosome reaction by Thapsigargin. *J Exp Zool* 267:350-355.

Mendoza C, Carreras A, Moos J, Tesarik J (1992) Distinction between true acrosome reaction and degenerative loss by one-step staining method using *Pisum sativum* agglutinin. *J Reprod Fertil* 85:755-763.

Miller DJ, Gong X, Shur BD (1993) Sperm require b-N-acetylglucosaminidase to penetrate through the egg zona pellucida. *Development* 118:1279-1289.

Moolenaar WH (1986) Effects of growth factors on intracellular pH regulation. *Annu Rev Physiol* 48:363-376.

Nelson N (1991) Structure and pharmacology of the proton-ATPases. *Trends Pharmacol Sci* 12:71-75.

Perona R, Serrano R (1988) Increased pH and tumorigenicity of fibroblasts expressing a yeast proton pump. *Nature* 334:438-440.

Reyes A, Goicoechea B, Rosado A (1978) Calcium ion requirement for rabbit spermatozoal capacitation and enhancement of fertilizing ability by ionophore A23187 and cyclic adenosine 3':5'-monophosphate. *Fertil Steril* 29:451-455.

Shapiro BM, Schackmann RW, Tombes RM, Kazazoglou T (1985) Couple ionic and enzymatic regulation of sperm behavior. *Curr Top Cell Regul* 26:97-113.

Sokal RR, Rohlf FJ (1981) *Biometry*, 2nd Edition. WH Freeman and Co. San Francisco.

Suárez SS, Wolf DP, Meizel S (1986) Induction of the acrosome reaction in human spermatozoa by a fraction of human follicular fluid. *Gamete Res* 4:407-432.

Turrini F, Sabolic I, Zimolo Z, Moewes B, Burckhardt G (1989) Relation of ATPases in rat renal brush-border membranes to ATP-driven H^+ . *J Memb Biol* 107: 1-12.

Uguz C, Vredenburg WL, Parrish JJ (1994) Heparin induced capacitation but not intracellular alkalization of bovine sperm is inhibited by Rp-Adenosine-3', 5'-Cyclic Monophosphothioate *Biol Reprod* 51:1031-1039.

Vredenburg-Wilberg WL, Parrish JJ (1995) Intracellular pH of bovine sperm increases during capacitation, *Mol Reprod Dev* 40:490-502.

Wong PYD, Lee WM, Tsang AYW (1981) The effects of extracellular sodium on acid release and motility initiation in rat caudal epididymal spermatozoa in vitro. *Exp Cell Res* 131:97-104.

Working PK, Meizel S (1983) Correlation of increased intraacrosomal pH with the hamster sperm acrosome reaction. *J Exp Zool* 227:97-107.

Yanagimachi R (1994) Mammalian Fertilization. In: E Knobil E, Neil JD (eds) *The Physiology of Reproduction*, 2nd edition. Raven Press LTD. New York. pp. 189-317.

Zeng Y, Oberdorf JA, Florman M (1996) pH regulation in mouse sperm: Identification of Na^+ , Cl^- , and HCO_3^- dependent and aryllaminobenzoate-dependent

regulatory mechanisms and characterization of their roles in sperm capacitation. Dev
Biol 173:510-520.

Fig. 1. Chlortetracycline fluorescence binding to rabbit spermatozoa. **(a)** Staining pattern observed in control spermatozoa incubated in Ca^{2+} -free medium. Almost no fluorescence can be detected in the sperm head, only the middle piece is slightly fluorescent. **(b)** After incubation in capacitating media, spermatozoa are distinctly fluorescent, particularly on the anterior, acrosomal region of the sperm head. A brightly fluorescent band in the equatorial region is clearly observable. The arrows indicate non-capacitated spermatozoa. **(c)** Fluorescence pattern at the end of the capacitating period, i.e. 6 h incubation in the presence of $2.5 \text{ mmol l}^{-1} \text{ CaCl}_2$, capacitated spermatozoa show a bright band of fluorescence around the sperm head (arrows). The double arrows indicate non-capacitated spermatozoa.

Fig. 2. Microscopic patterns of rabbit spermatozoa stained with CBB **(a)** or with FITC-PSA **(b)**. **(a)** Staining of the acrosomal region, forming a distinct apical ridge, indicates the presence of intact acrosomes in unreacted spermatozoa. Lack of blue staining is characteristic of acrosomal-reacted spermatozoa (*arrows*). **(b)** Unreacted spermatozoa show bright fluorescence of the anterior half of the sperm head. No fluorescence, or only a fluorescent band in the equatorial region, indicates loss of the acrosomal membranes (*arrows*).

Fig. 3. Time-course of the acrosome reaction induced by $10 \mu\text{mol l}^{-1}$ A23187 in ejaculated rabbit spermatozoa under the various experimental conditions studied. The bars indicate the standard deviation. Different letters indicate the existence of statistical significant differences ($p < 0.05$) between the data obtained under different experimental conditions. Different numbers indicate the existence of statistical significant differences ($p < 0.05$) between the data obtained at different incubation times but under the same experimental condition (two-way ANOVA). (see Materials and Methods).

Table 1.

In Vitro Fertilization of Rabbit Spermatozoa Incubated in Enriched Medium A

Spermatozoa	Incubation Time	No. of Ova	No. of Ova Cleaved	% Ova Cleaved *
Ejaculated	2	20	3	15 ^a
	4	28	7	25 ^b
	6	36	16	44 ^c
	8	25	12	48 ^c
Epididymal	2	24	5	21 ^a
	4	36	13	36 ^b
	6	42	22	52 ^c
	8	28	17	61 ^c

(*) Different superscript letters indicate significant differences ($P < 0.05$) when data were compared by means of the χ^2 test for proportions.

Table 2.
Percentage of Capacitated Rabbit Spermatozoa (CTC Staining) After
Incubation (6 h) Under Various Conditions

	n	Epididymal Spermatozoa	Ejaculated Spermatozoa
Without Ca²⁺	7	5 ± 3	4 ± 3
With 2.5 mmol l⁻¹ Ca²⁺	7	66 ± 7	43 ± 11 [§]
Ca²⁺ + 0.2 μmol l⁻¹ bafilomycin	7	25 ± 11*	16 ± 8*

Numbers indicate the mean ± standard deviation of the number of experiments indicated as n.

[§] Indicates the existence of significant differences (p <0.05) between the results obtained with epididymal and ejaculated spermatozoa.

*Indicates the existence of significant differences (p <0.05) between the results obtained in the absence and in the presence of bafilomycin A1 in the capacitating media.

Table 3.

Percentage of A23187 Acrosome-Reacted Rabbit Spermatozoa (CBB Staining) After a 6 h Incubation in the Presence or Absence of $0.2 \mu\text{mol l}^{-1}$ Bafilomycin A1.

Time (min)	n	Epididymal Spermatozoa		Ejaculated Spermatozoa	
		Bafilomycin		Bafilomycin	
		(-)	(+)	(-)	(+)
15	7	15 ± 4^a	$4 \pm 3^{a*}$	12 ± 5^a	$4 \pm 2^{a*}$
30	9	27 ± 5^b	$8 \pm 6^{ab*}$	23 ± 6^b	$8 \pm 3^{ab*}$
45	9	39 ± 3^c	$11 \pm 7^{b*}$	$31 \pm 5^{b+}$	$14 \pm 4^{b*}$

Numbers indicate the mean \pm standard deviation of the number of experiments indicated as n.

Different superscript letters in the same column indicate the existence of significant differences ($p < 0.05$) between the incubation times to study the acrosome reaction.

⁺ Indicates the existence of significant differences ($p < 0.05$) between the results obtained with epididymal and ejaculated spermatozoa.

*Indicates the existence of significant differences ($p < 0.05$) between the results obtained in the absence and in the presence of bafilomycin A1 in the capacitating media.