



**CASA ABIERTA AL TIEMPO**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**IZTAPALAPA**

**“PÉRDIDA DE LA ASIMETRÍA FOSFOLIPÍDICA DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA  
DEL ESPERMATOZOIDE DE CONEJO DURANTE LA CAPACITACIÓN Y LA  
REACCIÓN ACROSOMAL”.**

## **TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA

**M en C. Alejandro Ávalos Rodríguez**

### **COMITÉ TUTORAL**

**Cotutor: Dr. Adolfo Rosado García**

**Cotutora: Dra. Ana María Rosales Torres**

**Asesora: Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz**

**Asesora: Dra. Reyna Fierro Pastrana**

**MÉXICO DF.**

**2004**

**“El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma  
Metropolitana pertenece al 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 presento.

**M en C. Alejandro Ávalos Rodríguez**

El día ---26-- de julio de 2004

**COMITÉ TUTORAL**

**Cotutor: Dr. Adolfo Rosado García**

**Cotutora: Dra. Ana María Rosales Torres**

**Asesora: Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz**

**Asesora: Dra. Reyna Fierro Pastrana**

**Sinodal: Dr. Alberto Martín Guzmán Grenfell.**

## **COMITÉ TUTORAL**

### **DIRECTORES 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**

**DRA. ANA MARÍA ROSALES TORRES**

**PROFESOR TITULAR “C” DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
INVESTIGADOR NIVEL 1 DEL SISTEMA NACIONAL DE INVESTIGADORES**

### **ASESORES**

**ASESORA: DRA. ALDA ROCÍO ORTIZ MUÑIZ**

**PROFESOR TITULAR “C” DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
INVESTIGADOR NIVEL 1 DEL SISTEMA NACIONAL DE INVESTIGADORES**

**ASESORA: DRA. REYNA FIERRO PASTRANA**

**PROFESOR TITULAR “C” DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
INVESTIGADOR NIVEL 1 DEL SISTEMA NACIONAL DE INVESTIGADORES**

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

**ESTE PROYECTO CONTÓ CON EL FINANCIAMIENTO POR PARTE DEL CONACYT CON LA BECA CRÉDITO OTORGADA (REGISTRO 92031).**

**Y FINANCIAMIENTO POR PARTE DE CONACYT (NÚMERO DE PROYECTO: 37767- B)**

## ÍNDICE.

<b>I.- Resumen</b>	<b>9</b>
<b>II.- Summary</b>	<b>9</b>
<b>III.- Introducción</b>	<b>9</b>
<b>IV.- Antecedentes</b>	<b>11</b>
<b>1.- Espermatogénesis</b>	<b>11</b>
<b>2.- Modificaciones de la membrana plasmática del espermatozoide durante la maduración epididimaria</b>	<b>12</b>
<b>2.1.- Cambios en lípidos</b>	<b>12</b>
<b>2.2.- Cambios en la composición proteica</b>	<b>14</b>
<b>3.-Membrana plasmática del espermatozoide eyaculado</b>	<b>15</b>
<b>4.- Membrana plasmática del espermatozoide maduro</b>	<b>16</b>
<b>4.1.- Lípidos</b>	<b>17</b>
<b>4.1.a.- Fosfolípidos</b>	<b>17</b>
<b>4.1.b.- Lípidos neutros</b>	<b>18</b>
<b>4.1.c.- Glicolípidos</b>	<b>19</b>
<b>4.2.- Distribución heterogénea de los componentes estructurales de la membrana plasmática del espermatozoide</b>	<b>19</b>
<b>5.- Asimetría de la membrana plasmática</b>	<b>22</b>
<b>6.- Capacitación espermática</b>	<b>25</b>
<b>6.1.- Regulación de la fosforilación</b>	<b>25</b>
<b>6.2.- Canales iónicos</b>	<b>28</b>
<b>6.3.- Glicocáliz</b>	<b>30</b>
<b>6.4.- fluidez y permeabilidad membranal</b>	<b>31</b>
<b>6.5.- Movilidad</b>	<b>32</b>

<b>7.- Reacción Acrosomal</b>	<b>33</b>
<b>7.1- Unión del espermatozoide con la zona pelúcida</b>	<b>34</b>
<b>7.2- Agregación de receptores</b>	<b>39</b>
<b>7.3.- Cambios membranales durante la reacción acrosomal</b>	<b>40</b>
<b>7.3.1.- Fosforilación de Proteínas</b>	<b>40</b>
<b>7.3.2.- Proteínas G</b>	<b>41</b>
<b>7.3.3.- Canales iónicos</b>	<b>42</b>
<b>7.4.- Inducción de la reacción acrosomal</b>	<b>43</b>
<b>8.- La unión y fusión con el oolema</b>	<b>45</b>
<b>V.- Planteamiento del problema</b>	<b>51</b>
<b>VI.- Hipótesis</b>	<b>51</b>
<b>VII.- Objetivo general</b>	<b>51</b>
<b>VIII.- Objetivo particular</b>	<b>51</b>
<b>IX.- Material y métodos</b>	<b>52</b>
<b>X.- Resultados</b>	<b>57</b>
<b>XI.- Discusión</b>	<b>62</b>
<b>XII.- Conclusiones</b>	<b>69</b>
<b>XIII.- Bibliografía</b>	<b>74</b>

## I.- RESUMEN

Este estudio se realizó con la finalidad de evaluar la pérdida de la asimetría fosfolipídica de la membrana plasmática de la cabeza de espermatozoides de cola de epidídimo de conejo, durante la evolución de los procesos de capacitación y reacción acrosomal haciendo uso de la unión específica de la Anexina V (marcada con un trazador fluorescente) al fosfolípido fosfatidil-serina. Se usó Ioduro de propidio como control, no sólo para detectar la presencia de daño o muerte espermática, sino también para poder seleccionar aquellos espermatozoides que no han experimentado aún por completo la reacción acrosomal. La presencia y distribución de los sitios de unión de la Anexina V fue analizada usando citometría de flujo y microscopia confocal. Después de 6 horas de incubación en un medio capacitante los espermatozoides mostraron un ligero pero significativo incremento en el número de células teñidas positivamente con Anexina V. Los sitios de unión de la Anexina V que se produjeron en la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide durante la capacitación se detectaron principalmente en la región post-acrosomal. Después de la capacitación se indujo reacción acrosomal con ionóforo A23187 y con progesterona. Cuando se indujo con esta última, la localización de los sitios de unión de la Anexina V se detectaron principalmente en la región acrosomal pero con un alto número de sitios de unión en el área ecuatorial. Cuando la inducción de la reacción acrosomal se hizo con A23187 la translocación de fosfatidilserina se presentó principalmente por encima de la región acrosomal y también en la región post acrosomal. La pérdida de la asimetría fosfolipídica, característica de la membrana plasmática, que se observa inicialmente durante la capacitación y, posteriormente, durante la reacción acrosomal puede ser importante no solo para favorecer la ocurrencia de la fusión entre las membranas plasmáticas y acrosomal del espermatozoide, sino también para la fusión entre el espermatozoide y el ovocito.



## **II.- SUMMARY.**

This study was conducted to evaluate phosphatidylserine translocation in head plasma membrane of Percoll-gradient purified rabbit cauda epididymal sperm during capacitation and acrosome reaction (AR), using Annexin V. Propidium iodide was used as control to reject dead or dying cells. The presence and distribution of Annexin-V binding sites were analyzed using flow cytometry and confocal microscopy. After 6 h of incubation of sperm in capacitation medium, the number of cells positively stained with Annexin-V showed a small but significant increment. The Annexin-V binding sites produced during capacitation were found mainly in the post-acrosomal region of the sperm head plasma membrane. After AR induction with progesterone, the localization of phosphatidylserine was changed and the Annexin-V binding sites were found almost only in the acrosomal region but with higher number of binding sites in the equatorial area. On the contrary, after AR induction with A23187 phosphatidylserine translocation although predominant over the acrosomal region was also observed in the post-acrosomal region. Plasma membrane destabilization during capacitation and AR may be important for sperm-oocyte fusion.

### III.- Introducción.

Uno de los principales eventos que ocurren para dar paso a la generación de un organismo nuevo, es la unión entre el gameto masculino (espermatozoide, en los mamíferos) con un gameto femenino (ovocito, en los mamíferos). En el caso de los mamíferos, millones de espermatozoides son depositados en el tracto genital femenino, pero en el mejor de los casos, sólo uno de ellos tendrá éxito para fecundar un ovocito.

Durante la interacción del espermatozoide con el ovocito, ocurre una secuencia de eventos altamente regulada. En primera instancia los espermatozoides eyaculados son activados en el tracto reproductor femenino, en un proceso denominado capacitación, durante el cual experimentan una reorganización dramática de su membrana plasmática (Frits et al., 2000) y sólo aquellos que son exitosamente capacitados podrán unirse a la zona pelúcida del ovocito de manera especie específica. La unión del espermatozoide con la zona pelúcida produce en el espermatozoide una serie de señalizaciones que desencadenan la entrada de  $Ca^{2+}$  y la fusión de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa en múltiples sitios, proceso que se conoce como reacción acrosomal. El contenido acrosomal, compuesto por enzimas hidrolíticas, produce la digestión de la zona pelúcida del ovocito, lo cual ayuda al espermatozoide a penetrar a través de esta capa glicoproteica que rodea al gameto femenino. Durante la reacción acrosomal la membrana plasmática apical y la membrana acrosomal externa se fusionan para formar vesículas que se separan del espermatozoide. Al terminar la reacción acrosomal, la membrana acrosomal interna queda expuesta y los residuos de la membrana plasmática de la región anterior del espermatozoide pueden observarse como estructuras que parecen horquillas en los costados del espermatozoide. La

progresión del espermatozoide a través de la zona pelúcida, aparentemente facilitada por la existencia de sitios específicos de fijación entre la membrana acrosomal interna expuesta y las proteínas constituyentes de la zona pelúcida, lo conduce hasta el espacio perivitelino del ovocito (Frits et al., 2000). Aquí el espermatozoide se coloca de manera que su región ecuatorial (horquillas), queda en contacto y se fusiona con la membrana plasmática del ovocito (olema) (Frits et al., 2000) produciendo la penetración de la cabeza del espermatozoide al interior del citoplasma del gameto femenina.

La composición y organización de la membrana plasmática del espermatozoide regulan de manera específica los eventos que conducirán el destino de los espermatozoides, entre estos eventos están: la afinidad para factores de adhesión, la permeabilidad para solutos hidrofílicos, señalización celular y eventos de fusión (Dunina-Barkovskaya, 1998).

#### **IV.- Antecedentes.**

##### **1.- Espermatozoide maduro.**

La estructura básica de los espermatozoides maduros ha sido dividida en tres regiones altamente especializadas: **a) La cabeza.** Representa la parte más voluminosa y anterior de la célula espermática y esta directamente involucrada en todos los mecanismos con la interacción entre espermatozoide y el ovocito que darán inicio a la formación de un nuevo individuo. La cabeza del espermatozoide contiene poca cantidad de citoplasma y en ella se encuentran el núcleo y el acrosoma. El acrosoma es una vesícula compleja que contiene enzimas hidrolíticas, necesarias para la penetración de la zona pelúcida, (ZP) del ovocito por el espermatozoide (Yanagimachi et al., 1994; Frits et al., 2000); **b) La pieza media** en la cual se ha localizado todas las mitocondrias, encargadas de la producción de energía; y **c) El flagelo,** que le da la movilidad (Frits et al., 2000).

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

##### **2.- Membrana Plasmática del Espermatozoide Eyaculado.**

Muchas de las características de la membrana plasmática del espermatozoide, que determinan su capacidad fisiológica basal para realizar la fertilización del gameto femenino, ocurren durante el transcurso del espermatozoide a través del conducto epididimario. Tales cambios forman parte del proceso que se conoce como

Maduración epididimaria del espermatozoide. En la mayoría de las especies de mamíferos el espermatozoide ha adquirido su capacidad de movilidad progresiva y su capacidad fertilizante al llegar al segmento de unión entre la parte media y la parte caudal del epidídimo.

Los cambios principales que se producen en la superficie del espermatozoide durante la maduración epididimaria son: a) un incremento en la carga neta superficial, ya que en los espermatozoides obtenidos de cola de epidídimo la carga negativa es mayor que la de los obtenidos de cabeza, en diferentes especies (Bedford, 1963; Bedford, et al., 1973; Moore, 1979), b) modificaciones en la cantidad de sacáridos y glicoproteínas en la superficie de los espermatozoides, lo cual probablemente son la causas de los cambios en la carga neta superficial, c) aumento en la cantidad de ácido siálico (Cooper, et al., 1971; Yanagimachi et al., 1972), d) disminución en el contenido de lípidos, especialmente del colesterol, lo cual ha sido informado en cerdo, toro, carnero, cobayo, y rata (Dawson et al., 1964; Aveldaño et al., 1992), la proporción colesterol/fosfolípidos y las concentraciones de fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, cardiolipina, etanolamina, plasmalógeno y de ácidos grasos insaturados disminuyen en espermatozoides de carnero (Scott, 1967), mientras que en los espermatozoides de humano ocurren incrementos en la cantidad de esteroides sulfoconjugados (Lalumiere et al., 1976).

Nuevos y trascendentes cambios ocurren en la superficie del espermatozoide después de la eyaculación en el tracto genital femenino. Algunos de estos cambios han sido detectados con el uso de lectinas, las cuales tienen afinidad específica por algunos glicoconjugados de membrana. También se ha encontrado que antígenos de grupos sanguíneos (Edwards et al., 1964; Frits et al., 2000), antígenos de histocompatibilidad (Kerek et al., 1973) y factores de inmunosupresión, se adhieren

al espermatozoide al mezclarse con las secreciones de las glándulas accesorias del aparato reproductor masculino durante la eyaculación. Por ejemplo, los espermatozoides de humano adquieren lactoferrina (Hekman et al., 1969), ferrisplan (Koyama, et al., 1983; Frits et al., 2000). En el conejo se han encontrado proteínas de 20,000 daltons en el eyaculado que no son demostrables en espermatozoides de epidídimo (Oliphant et al., 1979; Nolan y Hammerstedt, 1997). En el toro se han encontrado proteínas de 25,000 y 14,000 daltons específicas del plasma seminal unidas a espermatozoides eyaculados (Vierla, et al., 1980).

## **2.- Distribución heterogénea de los componentes estructurales de la membrana plasmática del espermatozoide.**

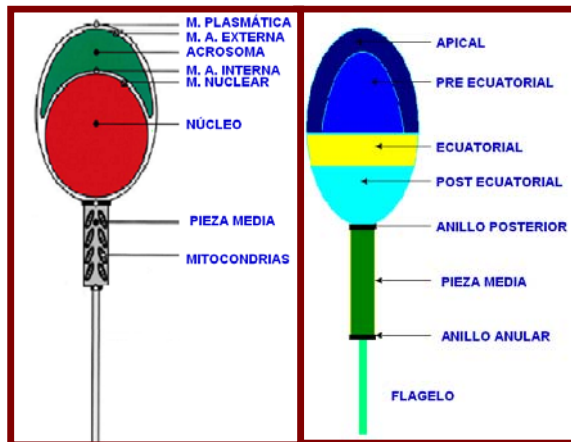
La membrana plasmática del espermatozoide se caracteriza por estar subdividida en regiones bien delimitadas a pesar de la reconocida capacidad de la membrana plasmática para la migración lateral de proteínas y lípidos. Estas regiones denominadas dominios difieren notablemente en composición y función (esquema1) (Frits et al., 2000).

La membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide (esquema1) está dividida en un dominio acrosomal (región anterior de la cabeza) y en un dominio postacrosomal (región posterior a la cabeza). El dominio acrosomal puede ser subdividido en 1.- segmento marginal (segmento apical, banda anterior y/o aro periférico), dominio que se encuentra sobre el área del acrosoma que sobresale de la región nuclear, 2.-el segmento principal (segmento acrosomal) dominio localizado por encima de la mayor porción del acrosoma y 3.- el dominio ecuatorial (acrosomal posterior) ubicado en los límites entre la parte posterior del acrosoma y la llamada región posacrosomal. El dominio marginal y del segmento principal, a menudo son

referidos como acrosoma anterior o como capa anterior. Estos dos dominios están separados por una media luna central en el caso de espermatozoides de cobayo y posiblemente de otras especies (Yanagimachi, 1994; Frits et al., 2000).

Esquema 1

#### PRINCIPALES COMPONENTES Y DOMINIOS DEL ESPERMATOZOIDE MADURO



*Los principales componentes del espermatozoide son la cabeza, pieza media y cola, en la cabeza se encuentra la membrana plasmática, la acrosomal externa, la acrosomal interna, el acrosoma, la cubierta nuclear y el núcleo. La membrana plasmática del espermatozoide se caracteriza por estar organizada en dominios y los principales son: la región apical, la preecuatorial, ecuatorial, postecuatorial, anillo posterior, pieza media, anillo anular y flagelo (Frits et al., 2000).*

La membrana plasmática del espermatozoide está compuesta de colesterol, glicolípidos, altas cantidades de plasmalógenos, fosfolípidos y otros lípidos de cadena alifática poliinsaturada. Los fosfolípidos forman las dos terceras partes del total de los componentes lipídicos de la membrana plasmática del espermatozoide. Los esteroides son los segundos lípidos más abundantes en el espermatozoide (Frits et al., 2000). Estudios realizados con fractura por congelación muestran que, en los espermatozoides de cobayo y de toro, la cantidad de esteroles en la parte anterior del acrosoma es 4 veces mayor que la encontrada en la región postacrosomal. Aunque el sulfato de colesterol es una pequeña parte del esteroles total, constituye un

componente de la mayor importancia en el dominio acrosomal de la membrana plasmática del espermatozoide humano (Yanagimachi, 1994; Frits et al., 2000).

La relación fosfolípidos / proteína de la membrana plasmática del espermatozoide de cerdo es de 0.68 en base al peso, sugiriendo que la cantidad de proteínas y lípidos en la membrana es aproximadamente la misma, aunque es posible que la relación proteína / lípidos en varios dominios de la membrana plasmática del espermatozoide sea diferente. Yanagimachi, 1994; Frits et al., 2000).

La composición y organización de los lípidos en la membrana plasmática del espermatozoide le confieren propiedades características (Frits et al., 2000). Aunque hay variación considerable entre las diferentes especies de mamíferos, la membrana plasmática contiene en promedio 70% fosfolípidos, 25 % lípidos neutros y 5 % de glicolípidos (en base molar) (Mann y Litwak-Mann, 1981; Frits et al., 2000).

Los fosfolípidos pueden ser divididos en dos grupos: fosfoglicerolípidos y esfingomielinas. Los fosfoglicerolípidos varían en estructura molecular porque la cabeza de su grupo polar es diferente, en la posición sn-3 del esqueleto del glicerol. Cada clase de fosfolípido contiene diferentes cadenas alifáticas tales como acil, alquil, alquenil, que pueden estar unidas a la posición sn-1 o sn-2 del esqueleto del glicerol (Parks and Hammerstedt, 1985). Las concentraciones de fosfolípidos en la membrana plasmática de las células espermáticas, son generalmente comparables a los de las membranas plasmáticas de las células somáticas. Por ejemplo el espermatozoide humano contiene una relación porcentual de 50 de fosfatidilcolina, 30 de fosfatidiletanolamina, 12.5 de esfingomielina, 3 de fosfatidilserina, 2.5 de cardiolipina y casi 2 de fosfatidilinositol. Por el contrario, la composición estructural de especies moleculares de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, así como de otros fosfolípidos, es considerablemente diferente entre los espermatozoides y las células



somáticas (Frits et al., 2000). La posición sn-2 del esqueleto del glicerol de los fosfolípidos espermáticos constituye una de las diferencias más notables en cuanto a la esterificación con ácidos grasos poli insaturados de cadena larga (casi exclusivamente ácido docosahexaenóico 22:6 y ácido docosapentaenóico, 22:5), además en la posición sn-1 contienen predominantemente cadenas alifáticas saturadas de 16 átomos de carbono de los cuales casi el 55 % está unido a un vinileter (plasmencilolina o plasmeniletanolamina) y 25 % con un grupo alquilo saturado (fosfatidilcolina o fosfatidiletanolamina) (Evans et al., 1980; Brouwers, 1998), solo el 20 % de la fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina contienen en el sn-1 un enlace de tipo éster con un ácido graso. Durante la capacitación la cantidad de fosfatidilcolina pueden aumentar debido a la metilación de la fosfatidiletanolamina (Frits et al., 2000 ).

Existen variaciones entre espermatozoides de diferentes especies, en cuanto a la concentración de lípidos neutros que componen su membrana plasmática, incluso hay diferencias entre espermatozoides del mismo individuo. El principal componente que varía, es el colesterol. El espermatozoide humano contiene una alta concentración de colesterol (40% del total de lípidos en base molar), sin embargo el cerdo contiene mucho menor cantidad (22% del total de lípidos base molar). Además de colesterol, el demosterol, sulfato de colesterol y ésteres de colesterol también están presentes en la membrana (Mann y Lutwak-Mann, 1981; Frits et al., 2000).

### **3.- Asimetría de la membrana plasmática.**

Las moléculas lipídicas que presentan la asimetría más marcada y constante, en cuanto a su distribución en la membrana plasmática de las células animales, son los glicolípidos, los cuales se caracterizan por estar únicamente en la mitad exterior de

la bicapa, quedando sus carbohidratos al descubierto en la superficie de la célula (Frits et al., 2000).

En cuanto a los componentes fosfolípidicos de la membrana plasmática de los espermatozoides, se encuentran asimétricamente distribuidos, de manera semejante a como acontece en la membrana plasmática de las células somáticas. Diversos métodos han revelado que los fosfolípidos como efigomielina (SM) y en menor grado fosfatidilcolina (PC), se encuentran principalmente en la cara externa de la membrana (Gadella et al., 1999 y Muller et al., 1996). Los aminofosfolípidos como fosfatidiletanolamina (PE) y especialmente la fosfatidilserina (PS) están localizados en la capa lipídica interna (esquema 2) (Rana et al, 1993; Hinkovska et al., 1986). Si bien es cierto que en general la fosfatidilserina no se encuentra en grandes proporciones en la membrana plasmática, es importante resaltar que por el hecho de que casi el 100% de este fosfolípido se encuentre en la cara interna de la membrana, la presencia de este en la cara externa es considerada como indicador de la pérdida de la asimetría membranal (Kuypers et al., 1996). La Anexina V es una proteína que en presencia de concentraciones adecuadas de  $Ca^{2+}$  tiene una alta especificidad por la fosfatidilserina, por lo cual ha sido usada como una técnica de elección para detectar pérdida de la asimetría de la membrana (Kuypers et al., 1996; Dachary-Prigent et al 1993; Rosales et al, 2000). La citometría de flujo es una técnica que en la actualidad es utilizada, como una prueba estándar confiable, para observar los cambios en la asimetría de las células espermáticas (Gadella et al., 1999; Nolan et al., 1995).

La formación y mantenimiento de la asimetría de las membranas biológicas es importante para sus funciones y por lo tanto para el mantenimiento de la célula (Herrman, et al., 1991; Op den, 1979). Los componentes estructurales de las

bicapas se encuentran en equilibrio. Dicho equilibrio es un balance de dos mecanismos. Primero todos los fosfolípidos difunden pasivamente a través de la bicapa, a una velocidad relativamente baja. Segundo los amino fosfolípidos son transportados activamente de la cara externa de la membrana hacia la cara interna por la acción de una enzima denominada translocasa de aminofosfolípidos dependiente de (ATP) y  $Mg^{2+}$  la cual mantiene el equilibrio de la membrana. Estudios reportados en eritrocitos han podido demostrar que los aminofosfolípidos son transportados desde la cara externa hasta la cara interna de la membrana por la aminofosfolípido translocasa, y que este movimiento es responsable de la distribución asimétrica de los fosfolípidos en los eritrocitos, así como en la membrana de otras células eucariontes (Devaux, 1990; Schroit et al., 1991). Cuando en la lámina externa de la bicapa aparece la fosfatidilserina, ésta es rápidamente devuelta hacia la lámina interior por la translocasa de amino fosfolípidos (Kuypers et al., 1996). La aminofosfolípido translocasa puede ser bloqueada por vanadato o por algún sistema que inhiba la producción de ATP (Backer et al., 1987).

El movimiento de la cara externa hacia la cara interna de la membrana se denomina “flip” y el movimiento de los fosfolípidos de la cara interna hacia la externa se denomina “flop” (Kuypers, et al., 1996).

Bajo la mayoría de las condiciones el mecanismo de “flip-flop” es extraordinariamente lento y su tiempo medio se mide en intervalos de horas o semanas (Homan, et al., 1988). Se ha encontrado que el movimiento de proteínas del exterior al interior de la membrana cataliza el paso de algunos fosfolípidos de una lámina a la otra por mecanismos de “flip-flop”, tanto dependientes de ATP como independientes de él, en un tiempo menor a 5 minutos (Deleke et al., 1985; Devaux, et al., 1990; Seigneuret, et al., 1984).

Otras enzimas, semejantes a las translocasas, han sido descritas recientemente como importantes en la regulación de la distribución asimétrica de los fosfolípidos de las membranas. Estas enzimas, llamadas “flipasas” regulan una rápida translocación de fosfolípidos por el movimiento de “flip-flop” (Schneider, et al., 1986). La actividad de “flip-flop” de fosfolípidos puede ser incrementada significativamente por la incorporación de antibióticos formadores de canales iónicos, como la anfotericina B (Schneider, et al., 1986).

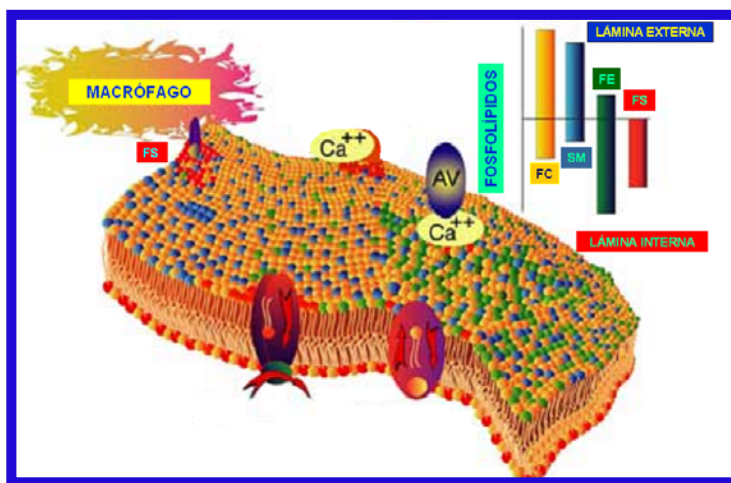
Los iones de calcio juegan un importante papel en algunos procesos fisiológicos por su habilidad para regular la estructura y función de las membranas celulares y por sus acciones en algunas vías metabólicas, particularmente aquellas involucradas en los procesos de contractibilidad y metabolismo energético.

Es conocido que el incremento de la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, inducido por el ionóforo A-23187, o por incorporación de  $\text{Ca}^{2+}$  al medio, estimula la producción de una distribución al azar de los lípidos de la membrana (Sulpice et al., 1994; Williamson et al., 1985 y Williamson et al., 1992). El desorden que se produce en la membrana ocasiona pérdida de la asimetría de los fosfolípidos de la membrana y posteriormente la formación de vesículas. La relación entre vesiculación y translocación de fosfolípidos fue demostrado por la observación de experimentos que mostraron espontáneos brotes y vesiculaciones en liposomas después de que se les indujo redistribución transmembranal de fosfolípidos (Farge y Deveraux, 1992). Desde hace mucho tiempo se conoce que ciertos ionóforos como el A23187 son capaces de unir y transportar cationes divalentes como el  $\text{Ca}^{2+}$  a través de barreras lipídicas, incluyendo las membranas celulares (Case et al., 1974), posteriormente se demostró que este ionóforo era capaz de incrementar el contenido de cAMP en células de la médula ósea. En virtud de la conocida relación del

metabolismo del calcio con el cAMP, algunos autores decidieron utilizar a este ionóforo como inductor de la capacitación espermática (Reyes, et al., 1978). Actualmente se sabe que el uso de A-23187, induce la reacción acrosomal (RA) por un mecanismo regulatorio intracelular que produce un rápido y masivo influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior del espermatozoide (Frits et al., 2000; Kirkman-Brown et al., 2002).

Esquema 2

#### ASIMETRÍA FOSFOLIPÍDICA DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA.



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

#### 4.- Capacitación Espermática.

Los espermatozoides eyaculados se pueden unir a la ZP sólo después de haber sido activados en el tracto reproductor femenino (Fraser, 1998). La activación del espermatozoide (capacitación), es un evento muy complicado y, a pesar de que ha sido estudiada ampliamente, aún no se tiene un conocimiento cabal, ni mucho menos, de los mecanismos que concurren a que acontezca normalmente. La capacitación induce cambios a nivel de la membrana plasmática del espermatozoide que se describen a continuación, los cuales aceleran su metabolismo, modifican su

patrón de movilidad y le permiten aumentar la afinidad por la zona pelúcida (Harkeman et al., 1998).

#### **4.1.- Regulación de la fosforilación.**

Se ha demostrado en diferentes especies de mamíferos incluyendo el humano, que un número considerable de proteínas llega a fosforilarse por acción de la tirosina cinasa durante la capacitación *in vitro* (Visconty y Kopf, 1998). Esto no se sabe si a nivel del tracto reproductor femenino durante la capacitación *in vivo* ocurre, debido a lo difícil que resulta evaluar la influencia que ejerce el oviducto y el efecto del periodo del ciclo estral sobre el espermatozoide *in situ* (Smith, 1998). Sin embargo, las investigaciones que se realizan sobre capacitación *in vitro*, son un potencial para examinar el efecto de diferentes compuestos, que median o inhiben la fosforilación de las proteínas durante la capacitación. Uno de los compuestos más importante es el bicarbonato, y su omisión no sólo inhibe la fosforilación proteica (Visconti et al., 1995; Leclerc et al., 1996), sino que también disminuye la posibilidad de que el espermatozoide se una con la zona pelúcida (Harkeman et al., 1998), además de inhibir la inducción de la hipermovilidad (Boatman y Robbins et al., 1991). Un segundo componente es la albúmina, su principal función es la de movilizar colesterol. Sin embargo, su función con el bicarbonato sobre la fosforilación no es del todo claro (Emiliozzi y Fenichel, 1997; Osheroff et al., 1999). Un tercer componente capacitante es el  $Ca^{2+}$ , su acción directa sobre el sistema de la tirosina cinasa en la fosforilación de proteínas ha sido difícil de examinar (varios procesos requieren  $Ca^{2+}$ ) y existen diferencias entre especies (Emiliozzi y Fenichel, 1997). Se podría decir que el bicarbonato juega un papel clave en la activación de la fosforilación de proteínas en el espermatozoide de mamíferos.

El bicarbonato se encuentra en bajas concentraciones en la cola de epidídimo del espermatozoide (<1 mM) y se confronta con niveles más elevados (>15 mM) cuando entra al tracto reproductor femenino, indicando que el bicarbonato tiene una posible función *in vivo* (Harrison, 1996). Los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular pueden elevarse por entrada de bicarbonato, vía canales iónicos en la membrana plasmática ( $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ ) (Ain et al., 1999), intercambio  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  (Jensen et al., 1999). Una explicación alternativa para la entrada de bicarbonato al espermatozoide es que los niveles de  $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{CO}_3$  se encuentran en equilibrio en los compartimentos intra y extracelular por la difusión del gas a través de la membrana plasmática del espermatozoide (Parkkila et al., 1991). La anhidrasa carbónica que está presente en la cabeza del espermatozoide, podría estar involucrada en mantener las concentraciones intracelulares altas de bicarbonato, por conversión del  $\text{CO}_2$  que se difunde (Parkkila et al., 1991).

El bicarbonato es capaz de unirse a la adenilato ciclasa (AC) en sitios específicos del espermatozoide y desencadenar un aumento en la concentración de AMPc (Okamura y Sugita et al., 1983; Okamura et al., 1985; Garty y Salomón, 1987). Un aumento en la concentración de AMPc activa las proteínas cinasas dependientes de AMPc (PKA) y la activación de PKA induce las vías de fosforilación de tirosina. La inhibición de fosfatasa que son específicas para residuos de fosfoserina y fosfotreonina (PP1 y PP2A) incrementan el número de espermatozoides capacitados (Furuya et al., 1993). El vanadato es conocido como un fuerte inhibidor de las fosfatasa para tirosina así como de otros sistemas enzimáticos dependientes de ATP y que se ha demostrado inhiben significativamente la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por progesterona (Bonaccorsi et al., 1995).

La fosforilación de tirosina de proteínas espermáticas está relacionada con un aumento en la afinidad con la zona pelúcida (ZP) (Pukazhenthil et al., 1998) y con la reacción acrosomal (Benoff et al., 1998), e hipermovilidad (Nassar et al., 1999).

#### **4.2.- Canales iónicos.**

La iniciación de la reacción acrosomal es como en otros eventos de fusión membranal dependientes de un incremento masivo de los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular de los espermatozoides (Bailey y Storey, 1994; Naz et al., 1991). La concentración de  $Ca^{2+}$  extracelular se requieren para la capacitación espermática y para la reacción acrosomal (Visconti et al., 1995; Kaul et al., 1997). Bajas concentraciones de  $Ca^{2+}$  extracelular (90  $\mu$ M) en combinación con ionóforo de  $Ca^{2+}$  se induce la capacitación pero no la reacción acrosomal en espermatozoides de ratón, mientras que concentraciones extracelulares altas (1.8 mM) son apropiados para inducir la reacción acrosomal (Fraser y McDermott, 1992). La adición de agentes quelantes de  $Ca^{2+}$  (necesarios para estudiar la capacitación espermática independiente de  $Ca^{2+}$ ) en combinación con técnicas de análisis de imágenes (Harrison et al., 1993; Suarez y Dai, 1995; Cordoba, 1997),  $Ca^{2+}$  radiactivo (Adeoya-Osiguwa y Fraser, 1993) y micro electrodos selectivos de iones (Ruknudin y Silver, 1990), han mostrado un incremento en la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  en espermatozoides durante la capacitación *in vitro*.

La membrana plasmática del espermatozoide tiene diferentes formas para introducir  $Ca^{2+}$  al interior de la célula:

- a).- Canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje (Benoff, 1998).
- b).- ATPasas dependientes  $Ca^{2+}$  (Ashraf et al., 1994).
- c).- Intercambiadores de  $Na^+/Ca^{2+}$  (Rufo et al., 1984) y probablemente otros.



Además de estas se ha descrito la presencia de IP3 dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  en el acrosoma (Walensky y Zinder, 1995) así como la presencia de ATPasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  en el acrosoma, esto sugiere que el acrosoma podría servir como un regulador intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . No obstante el  $\text{Ca}^{2+}$  acrosomal parece ser inmovilizado por proteínas o como cristales debido al pH ácido del acrosoma (Martinez-Menarguez et al., 1996) debe recordarse que los espermatozoides carecen de retículo endoplásmico. Además las mitocondrias no están localizadas en la cabeza del espermatozoide por lo cual lo más probable es que no pueden influir en las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ . Se ha postulado que los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en el citoplasma se acumulan en bajas concentraciones en espermatozoides de eyaculados frescos por la sensibilidad de la calmodulina ATPasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  que inhibe la capacitación. La inhibición de calmodulina o calmodulina sensible a las ATPasas –  $\text{Ca}^{2+}$  produce un incremento en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , que se refleja en una mayor proporción de espermatozoides capacitados (Adeoya-Osiguwa y Fraser, 1993; Fraser et al., 1995). Esto sugiere que la constante circulación de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático por ATPasas- $\text{Ca}^{2+}$  juega un papel importante en la prevención de la capacitación prematura de los espermatozoides, sin embargo la inhibición de los intercambiadores de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  por un péptido de plasma seminal de 10 kDa (caltrina) previene los aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  por los espermatozoides de bovino en eyaculados frescos (Rufo et al, 1984; Rufo et al., 1982). La PKC y el voltaje dependiente de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  parecen estar involucrados en los incrementos de  $\text{Ca}^{2+}$  (Cordoba et al., 1997), a este respecto la despolarización del potencial de la membrana plasmática es un prerequisite para que la zona pelúcida desencadene la reacción acrosomal (Zeng et al., 1995; Arnoult et al., 1996).

### **4.3.- Glicocálix**

El glicocálix podría ser importante en la comunicación intercelular de los gametos, porque forma parte de la capa extracelular de la superficie del espermatozoide. Además de esto, la polarización natural del glicocálix podría ser relevante para la organización de las moléculas de la membrana plasmática por las cadenas de carbohidratos, que está en contacto directo con la membrana plasmática del espermatozoide vía las proteínas integrales de la membrana y los glicolípidos.

El glicocálix se altera durante la capacitación cómo se muestra por los estudios de uniones a lectinas (Yanagimachi, 1994). La redistribución de glicolípidos durante la capacitación se ha mostrado como la liberación de factores descapacitantes durante la capacitación (Adeoya-Osiguwa y Fraser, 1996; Fraser, 1998) y otros factores que se unen a la membrana plasmática (Töpfer-Petersen et al., 1998). Se ha establecido que la eliminación de factores descapacitantes inducen la activación de tirosinasa en proteínas transmembranales (Yanagimachi, 1994). La interacción de estas proteínas transmembranales con la ZP conduce a la agregación de más proteínas transmembranales y subsecuentemente incrementen la actividad de tirosina. La eliminación de componentes superficiales, dejan al descubierto los receptores para progesterona en la membrana plasmática del espermatozoide, de acuerdo a esto se ha demostrado que en espermatozoides de cola de epidídimo de perros, más del 90 % tienen afinidad por la progesterona, mientras que los espermatozoides de eyaculados no la tienen debido a que algunos factores que se agregan a la membrana se secretan en la próstata (Sirivaidyapong et al., 1999). Los espermatozoides que exponen receptores funcionales a progesterona son los que inician la reacción acrosomal cuando se estimulan con esta (Sirivaidyapong et al., 1999; Cheng et al., 1998).

#### **4.4.- Fluidez y permeabilidad membranal.**

La composición de los fosfolípidos y su relación con el colesterol regulan la fluidez y permeabilidad iónica de las membranas biológicas y ambos cambian durante la capacitación (Cross, 1998). En el caso de los espermatozoides humanos existen evidencias de que la capacitación *in vitro* involucra la eliminación de colesterol de la membrana plasmática y que la pérdida de lípidos membranales durante este evento parece ser un fenómeno reversible asociado con la presencia de proteínas aceptoras de esteroides en el medio de incubación (Yanagimachi, 1994; Cross, 1998). Cuando se incuban espermatozoides con un medio capacitante químicamente definido y después se estudia la concentración de lípidos (colesterol y fosfolípidos) en las células completas y fraccionadas, se observa que el colesterol y la relación colesterol-fosfolípidos disminuye en un 20 y 30% en la fracción de la cabeza. La adición de líquido folicular o suero sanguíneo a este medio, sin embargo produce la eliminación del 40-50% del colesterol membranal, el cual es atrapado por las lipoproteínas y albúmina presente en estas secreciones (Cross, 1998).

Las alteraciones físicas y/o químicas de la bicapa de lípidos membranales durante la capacitación parece tener como resultado adicional la inducción de redistribución en las proteínas intrínsecas (Yanagimachi, 1994; Cross, 1998).

#### **4.5. Movilidad.**

En diferentes especies de mamíferos se han identificado cambios característicos en la movilidad espermática asociados con la etapa final de la capacitación y el disparo de la reacción acrosomal, tanto *in vivo* como *in vitro*: estos cambios en el patrón de movilidad se conocen genéricamente con el término de "hiperactivación". Proceso

descrito por primera vez en el hámster y evidenciado en numerosas especies. Tras la capacitación y antes de comenzar la reacción acrosomal, los espermatozoides adquieren un movimiento muy vigoroso, conocido con el término en inglés de “Whiplash Motility” (Movilidad tipo látigo), caracterizado por un gran aumento en la frecuencia y en la amplitud de movimientos del flagelo, lo que le proporciona un gran empuje para la penetración a través de la zona pelúcida (Gafo, et al., 1994). La importancia funcional de la hiperactivación puede incluir la regulación del transporte espermático en el oviducto y la generación de la fuerza requerida para la penetración de la capa de células de la granulosa y de la zona pelúcida en el ovocito. La movilidad espermática es considerada como uno de los parámetros importantes en el proceso de fertilización, ya que participa tanto en el transporte de los espermatozoides hacia la región ampular de la trompa de falopio, así como durante la interacción de los gametos y los eventos previos a la fusión de los mismos. El primer cambio en el patrón de movilidad que se observa *in vitro* después de la eyaculación, coincide con la eliminación del plasma seminal.

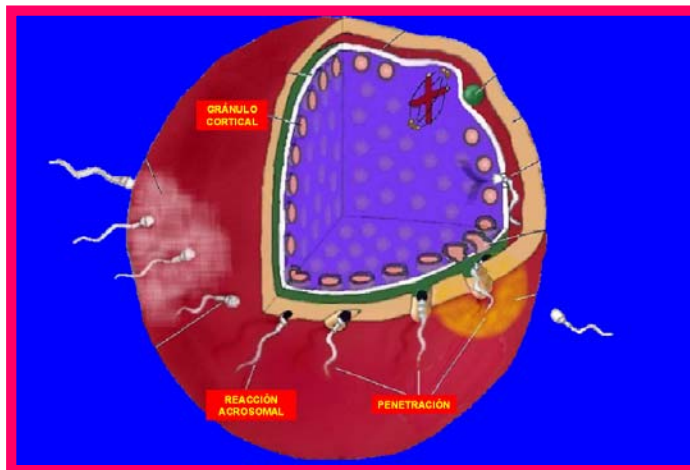
##### **5.- Reacción Acrosomal.**

En condiciones *in vivo*, la reacción acrosomal, se inicia inmediatamente después de la unión primaria del espermatozoide a la ZP del ovocito (Wassarman, 1992). La membrana plasmática apical de la cabeza del espermatozoide se fusiona con la membrana acrosomal externa en múltiples sitios, lo que desencadena la liberación del contenido acrosomal (Esquema 3) (Saling et al., 1979). Durante la reacción acrosomal, las enzimas hidrolíticas son secretadas para hidrolizar y disolver la matriz de la ZP de manera local en la dirección inmediata de la penetración del espermatozoide, lo cual finalmente asegura la entrada del espermatozoide al

espacio perivitelino (Llanos et al., 1993). Diversos estudios apoyan la evidencia de que la reacción acrosomal es un indicador claro de que ya se ha realizado la capacitación espermática (Frits et al., 2000). Los espermatozoides capacitados tienen una membrana plasmática desestabilizada y por ello son sensibles a pequeños cambios ambientales cuando se comparan con los no capacitados (Gadella y Harrison, 2000). Por ello, la adición de  $Ca^{2+}$  y de A23187 inducen de manera efectiva la fusión de la membrana plasmática y la acrosomal externa, mientras que en los no capacitados con una membrana más rígida no se induce la fusión membranal bajo las mismas condiciones (Cheng et al., 1996). La desestabilización de la membrana plasmática de los espermatozoides capacitados, los hace también más vulnerables a ligeros cambios en la temperatura (un ligero enfriamiento de 38.5 a 30°C) induce reacción acrosomal espontánea, pero esto no ocurre en espermatozoides que no han sido capacitados (Gadella y Harrison, 2000).

Esquema3

### PROCESO DE REACCIÓN ACROSOMAL



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

### **5.1.- Unión espermatozoide con la zona pelúcida.**

La unión de espermatozoides a la zona pelúcida (ZP) es el primer paso para la fertilización y es especie específica para ambos gametos. La unión del espermatozoide con la zona pelúcida ocurre en sitios específicos relacionados con los constituyentes proteicos de la ZP.

La reacción acrosomal no debe ocurrir antes de la unión con la ZP debido a que la maquinaria enzimática que se libera del acrosoma mediante este proceso es necesaria precisamente para la penetración de la zona. Los espermatozoides que experimentan reacción acrosomal prematura son considerados incompetentes para la fecundación, debido a que ya ocurrió la liberación de enzimas y no podrán penetrar la zona pelúcida. Además los cambios membranales que acompañan a la reacción acrosomal son indispensables para la fusión entre los gametos. Así pues, los espermatozoides que alcanzan el espacio perivitelino son siempre reaccionados y capaces de fusionarse con el ovocito (Toshimori, 1982).

La nomenclatura de las proteínas de la ZP varía entre las diferentes especies de mamíferos. Harris et al., en 1994, después de hacer un estudio con varias especies propuso hacer una división de las proteínas y nombrarlas con la siguiente nomenclatura: ZPA, ZPB y ZPC basada en las variaciones de secuencia y sus homologías.

En la caracterización de las proteínas de ZP, además de la secuencia de aminoácidos, se ha considerado su combinación con carbohidratos (Bleil y Wasarman, 1980; Nakano et al., 1996). Se ha demostrado que la eliminación enzimática o digestión parcial de las glicoproteínas para liberar los carbohidratos unidos tanto en uniones N- como O-glicosídicas disminuyen o suprimen la unión espermatozoide-ZP (Ozgur et al., 1998). En experimentos con espermatozoides de

humano, se ha demostrado que anti-ZPA podría inhibir la unión espermatozoide-ZP, mientras que anti-ZPC no inhibe la unión de espermatozoide-ZP (Sirivaidyapong et al., 1999). En espermatozoides de cerdo, ZPB y ZPC parecen estar involucradas en la unión espermática a la ZP (Yurewicz et al., 1998) y en conejo, ZPB es el receptor primario del espermatozoide (Prasad et al., 1996). Un grupo de investigadores ha propuesto que la estructura completa de la ZP es necesaria para la óptima unión del espermatozoide (Flesch et al., 1999).

El reconocimiento y la fijación del espermatozoide a la ZP puede ser subdividida en dos fases:

1.-La unión primaria, en donde la región acrosomal de la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide se une a la ZP por medio de proteínas específicas localizadas en la zona apical (Yanagimachi, 1994). Es importante mencionar que los receptores para la ZP son modificados durante la capacitación espermática, incrementándose dramáticamente la afinidad de unión del espermatozoide a la ZP (Yanagimachi, 1994; Harkeman et al., 1998). Finalmente esta unión desencadena la producción de la reacción acrosomal.

2.- La unión secundaria se presenta cuando los espermatozoides reaccionados exponen un grupo de proteínas intra-acrosomales con una alta afinidad por la ZP. La exocitosis del contenido acrosomal ayuda al espermatozoide a penetrar a través de la zona pelúcida

La unión espermatozoides-ZP resulta de manera casi instantánea en la reacción acrosomal (Fazeli et al., 1997). La cascada de señales celulares no está completamente clara, se considera que las proteínas integrales de la membrana plasmática están involucradas mediante sus dominios extracelulares, en la unión con

la ZP y sus dominios citosólicos funcionales como un sitio para la activación o transducción de señales (Brewis y Wong, 1999). Más de una entidad puede estar involucrada en esta unión, como está demostrado en resultados obtenidos en ratones "Knockout" carentes de  $\beta$ 1, 4-galactosiltransferasa (Shur, 1999).

Aunque se ha postulado la existencia de varios receptores para la ZP en el espermatozoide (Snell y White, 1996) solamente dos receptores han sido ampliamente estudiados, ambos localizados en el dominio apical de la membrana plasmática: a).- Una proteína de 95 KDa inicialmente descrita en el ratón, pero ya demostrada en varias especies de mamíferos (Leyton y Saling, 1989; Pukazhenthil et al., 1998). La unión del espermatozoide a la ZP induce la fosforilación de un residuo de tirosina (Leyton y Saling, 1989; Brewis et al., 1998; Naz, et al., 1996) de la proteína p95, proceso que se asume está involucrado en la iniciación de la reacción acrosomal (Leyton et al., 1992).

Las células espermáticas de ratones deficientes en  $\beta$ 1, 4-galactosiltransferasa son capaces de fecundar (Lu y Shur, 1999) con una eficiencia extraordinariamente reducida,. Esto se debe a que estas células poseen mucho menor afinidad por ZPC y no experimentan fácilmente la reacción acrosomal, comparado con células de animales normales (Lu y Shur, 1997).

Proteínas pequeñas asociadas a espermatozoides, como las adhesinas del espermatozoide del cerdo, probablemente contribuyen a afirmar la unión del espermatozoide con la zona pelúcida (Töpfer-Petersen, 1998), aunque la participación directa de estas proteínas en la adhesión a la ZP al espermatozoide, durante la -\*fecundación, aún no se ha confirmado. De hecho se ha demostrado, que estos componentes estrechamente unidos, son liberados de la superficie del espermatozoide durante la interacción con las células epiteliales del oviducto



(Suárez, 1987). A partir de los estudios realizados en cultivos primarios de células de oviducto, se demostró que los espermatozoides se unen al oviducto por un período largo de tiempo. Las células liberadas estaban capacitadas y mostraron gran afinidad por la ZP.

Las proteínas intra acrosomales comienzan a exponerse después de la reacción acrosomal y participan en una unión más firme del espermatozoide con la ZP (unión secundaria a ZP) (McLeskey et al., 1998). La ZPA puede ser el modelo de unión secundaria en la ZP (Bleil y Wassarman, 1988). Varias proteínas se han identificado como proteínas de unión secundaria a la ZP: PH-20 (Hunnicuttt et al., 1996; Lin et al., 1993), sp38 (Mori et al., 1994; Sabeur et al., 1997), acrosina y P-selectina (Oehninger, et al., 1998). La acrosina y la PH-20 tienen gran afinidad por la ZP y actividad de hialuronidasa y proteasas, respectivamente. La unión de espermatozoides a la ZP puede prevenir la liberación de estas enzimas, mientras tanto su actividad enzimática es utilizada para digerir la matriz de la ZP seguida por la unión a un nuevo sustrato, lo que finalmente asegura que el espermatozoide cruce la ZP (Wassarman y Litscher, 1995).

## **5.2.- Agregación de receptores.**

La proteína ZPC soluble induce la reacción acrosomal en espermatozoides de varias especies de mamíferos (Bleil y Wassarman, 1983). Esta interacción es probablemente inducida por la agregación de receptores para la proteína de la ZP en el dominio acrosomal de la membrana del espermatozoide, lo cual es mediado por la unión inicial, primaria de la ZPC.

La agregación de receptores es común en la transducción de señales. La hormona del crecimiento se une por un instante a sus dos receptores, e induce la dimerización de estos receptores. Lo que resulta en la activación de una tirosina cinasa y la subsecuente fosforilación de las tirosinas del receptor, en seguida una variedad de moléculas de señalización son reclutadas y/o activadas (Argetsinger y Cater-Su, 1996).

Las proteínas G también se han implicado en la transducción de señales por dimerización de receptores (Gouldson et al., 1998). Existen varios modelos de las vías de señalización, incluyendo los receptores acoplados a proteínas G, los cuales podrían jugar un importante papel en la reacción acrosomal inducida por ZP (Bastiaan et al., 1999).

### **5.3.- Cambios membranales durante la reacción acrosomal.**

#### **5.3.1.-Fosforilación de proteínas.**

La fosforilación de tirosinas, no solamente se ha implicado en la capacitación, sino también en la reacción acrosomal: la fosforilación de la tirosina p95 se aumenta después de la unión con ZPC (Leyton y Saling, 1989), lo cual es debido a la autofosforilación inducida por ZPC mediada por la agregación de p95. Los inhibidores de la tirosina cinasa bloquean y la reacción acrosomal inducida por ZP (Leyton et al., 1992). La unión de la ZPC a p95 también estimula la fosforilación de PLC $\gamma$  en espermatozoides de ratón capacitados y este efecto se evita en presencia de inhibidores de tirosina cinasa (Tomes et al., 1996). La capacitación espermática resulta en la translocación de PLC $\gamma$  lo cual se cree es resultado de la fosforilación de tirosinas (Tomes et al., 1996). La reacción acrosomal inducida por la ZP puede ser bloqueada por los inhibidores de tirosina cinasas, pero no se afecta la movilidad ni la

reacción acrosomal inducida por ionóforo de calcio, por lo tanto la capacitación, tampoco se afecta (Pukazhenthil et al., 1998). Brewis et al., (1998), demostró que la ZP recombinante humana, induce reacción acrosomal en espermatozoides humanos capacitados y esto coincidió con un aumento en la fosforilación de tirosinas de una proteína de 95 KDa. La progesterona también es capaz de inducir reacción acrosomal, e induce entrada de  $Ca^{2+}$  al espermatozoide. La inhibición de tirosinoquinas reduce la entrada de  $Ca^{2+}$  inducida por progesterona (Bonaccorsi et al., 1998)

Otras proteín-quinas pueden estar involucradas en la inducción de la reacción acrosomal. La estaurosporina, un inhibidor de la PKC, bloquea la reacción acrosomal inducida por la ZP en espermatozoides humanos y de otros mamíferos, pero no afecta su movilidad (Liu y Baker, 1997; Breitbart et al., 1992; Lax et al., 1994). La reacción acrosomal de espermatozoides humanos, inducida por PAF es afectada por los inhibidores de PKC, PTK y PKA (Sengoku et al., 1996). Posiblemente debido a que existe un entre cruzamiento en la señalización de estas tres cinasas. De hecho, el entre cruzamiento en la señalización de PKA y PKC se ha propuesto como inductor de la reacción acrosomal en el espermatozoide humano (Doherty et al., 1995).

### **5.3.2.- Proteínas G**

Las proteínas G participan en la señalización, virtualmente de todas las células del mamífero (Wess, 1997), y muy probablemente estén involucradas en la reacción acrosomal. Los espermatozoides del mamífero poseen un sub grupo de proteínas G, distribuidas sobre diferentes regiones que incluyen el segmento ecuatorial y el acrosoma (Garty et al 1988; Merlet et al., 1999). La reacción acrosomal inducida por

ZP puede inhibirse por la toxina pertussis (inhibidor de las proteínas  $G_i$ ) sin afectar la unión con la ZP (Wilde et al., 1992). Las proteínas  $G_i$  son directamente activadas por la ZPC (Cordoba et al., 1997). De hecho, la estimulación no fisiológica de las proteínas G con  $GTP\gamma S$ ,  $GppNHp$ , mastoparan y AIF-4 también inducen reacción acrosomal (Brandelli, 1997). La ZP induce la agregación de  $\beta 1,4$ -galactosiltransferasa y se ha sugerido que esto activa a las proteínas G en el espermatozoide de ratón (Gong et al., 1995). La activación de las proteínas G por la unión de la ZP se sabe aumenta la actividad de AC (Leclerc y Kopf, 1999). Además, la unión con ZPC induce la alcalinización vía proteína  $G_i$  y canal de cationes poco selectivo (insensible a la toxina pertussis) (Arnoult et al., 1996). Los efectos concernientes a la despolarización y alcalinización aparentemente abren los canales de  $Ca^{2+}$  sensibles a voltaje tipo T (Arnoult et al., 1996).

### **5.3.3.- Canales iónicos.**

La reacción acrosomal es una serie de eventos en los que se requieren altas concentraciones de  $Ca^{2+}$  citosólico (intervalos de mM), para que se puedan fusionar las membranas. En los espermatozoides capacitados, las concentraciones citosólicas de  $Ca^{2+}$  son considerablemente bajas ( $\mu M$ ) y como se ha mencionado antes, los espermatozoides no poseen una reserva de  $Ca^{2+}$  que puedan movilizar. Sin embargo el  $Ca^{2+}$  extracelular cruza la membrana plasmática antes del inicio de la reacción acrosomal. La unión del espermatozoide a la ZP se acompaña de una entrada significativa de  $Ca^{2+}$  (Bailey y Storey, 1994; Brewis et al., 1996). Los canales de  $Ca^{2+}$  activados por voltaje bajo están completamente activos después de la interacción con la ZP, lo que conduce la entrada de  $Ca^{2+}$  necesario para la RA. La unión de ZPC al espermatozoide induce despolarización de la membrana desde

aproximadamente  $-60$  mV a  $-25$  y  $-20$  mV, Vía un canal catiónico poco selectivo y una alcalinización dependiente de proteína  $G_i$ , lo cual resulta en la apertura de canales de  $Ca^{2+}$  dependiente de voltaje (Arnoult et al., 1996). Sin embargo la apertura dependiente de  $G_i$ , de los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje, se ha observado es independiente de alcalinización (Linares-Hernández et al., 1998). La apertura de los canales dependientes de voltaje tipo T se cree son responsables de la entrada de  $Ca^{2+}$ , necesaria para la reacción acrosomal. Otros tipos de canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje (subunidades) están presentes en el espermatozoide, en lugares específicos (Westenbroek y Babcock, 1999), sin embargo, no se les conoce una función específica en la reacción acrosomal (Publicover y Barratt, 1999). Se ha demostrado que la vía por la cual en varias especies la progesterona induce reacción acrosomal es el incremento en las concentraciones de  $Ca^{2+}$  intracelular. Posiblemente, esta hormona activa directamente los canales de calcio (Foresta et al., 1993) o indirectamente vía canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje.

Los canales de sodio, pueden también estar involucrados en la inducción de la reacción acrosomal, ya que el amilorido, un inhibidor de los canales de sodio, inhibe la reacción acrosomal y el ionóforo de monensina aumenta la reacción acrosomal (Llanos, 1994).

#### **5.4.- Inducción de la reacción acrosomal.**

Los espermatozoides, como otras células de mamíferos (Meyer et al., 1998), poseen receptores membranales para progesterona (receptor de progesterona no genómico) (Blackmore y Lattanzio, 1991; Sebeur et al., 1996). Estos receptores difieren considerablemente de los genómicos localizados en el citosol de las células somáticas (Kumar y Thompson, 1999). El receptor membranal espermático, posee

baja afinidad por la progesterona, cuando se compara con el genómico ( $\mu\text{M}$  y  $\text{pM}$ , respectivamente) (Sebeur et al., 1996). Sin embargo, el líquido folicular contiene gran cantidad de progesterona (aprox.  $6 \mu\text{g/ml}$  en líquido folicular contra  $10 \text{ ng/ml}$  en el suero (Libersky y Boatman, 1995), este líquido es liberado durante la ovulación, por lo tanto la ZP puede estar impregnada con altos niveles de progesterona.

La concentración fisiológica calculada de progesterona que podría rodear al espermatozoide en el oviducto, justo en el momento de la ovulación es de  $0.3 \mu\text{g/ml}$ . Esta dosis de progesterona, in vitro, es capaz de inducir reacción acrosomal en varias especies de mamíferos (Osman et al., 1989; Melendrez et al., 1994; Baldi et al., 1991). Las señales de transducción involucradas en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  por progesterona son inciertas. La unión de progesterona y la estimulación de un receptor para el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA)/canal de  $\text{Cl}^-$  ha sido estudiado en el cerebro (Majewska et al., 1986). La idea de que la progesterona actúa vía receptor  $\text{GABA}_A$ /canal  $\text{Cl}^-$  es apoyada por el descubrimiento de que GABA se une a los espermatozoides humanos y por el hecho de que la progesterona también estimula la entrada de  $\text{Cl}^-$  (Meizel y Turner, 1996) y además porque este efecto de la progesterona fue bloqueado por antagonistas del receptor  $\text{GABA}_A$ /canal  $\text{Cl}^-$  (Melendrez y Meizel, 1995; Roldan et al., 1994). La activación del receptor  $\text{GABA}_A$  por progesterona resulta en un aumento de la actividad de la fosfolipasa C (PLC) y en el aumento en la producción de diacilglicerol (DAG) en el espermatozoide. La entrada de Cloro está involucrada en la despolarización de la membrana y la subsecuente entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje (Espinosa et al., 1998).

Se ha reportado que la reacción acrosomal mediada por progesterona puede ser bloqueada por inhibidores de tirosinas cinasas, lo cual sugiere que la fosforilación

de tirosinas puede ser una vía de acción de esta hormona (Bonaccorsi et al., 1995). Esto sugiere, que la progesterona actúa vía fosforilación de tirosinas. Los inhibidores de tirosinas cinasas no solo bloquean los efectos de la progesterona, sino también la capacitación, la cual fisiológicamente se ha completado antes de que los espermatozoides sean sensibles a la progesterona (Baldi et al., 1995).

La progesterona exhibe dos sitios de unión en la membrana del espermatozoide (Baldi et al., 1999). El aislamiento e identificación de los receptores de la membrana plasmática para progesterona falta por realizarse.

## **V.- Planteamiento del problema.**

El espermatozoide del mamífero es capaz de fertilizar exitosamente al óvulo solo después de haber experimentado la maduración epididimaria, la capacitación y la reacción acrosomal. Durante la capacitación se presentan una serie de cambios entre los que destacan, la reorganización de proteínas, carbohidratos, y lípidos; cambios en el metabolismo de lípidos y salida de colesterol de la membrana plasmática, aumento en la permeabilidad de la membrana e hipermovilidad. Una vez concluido este proceso, ocurre la reacción acrosomal, la cual es un evento irreversible de exocitosis que se inicia fisiológicamente cuando el espermatozoide capacitado entra en contacto con la zona pelúcida, esto provoca en el espermatozoide, la fusión entre la membrana plasmática y la acrosomal externa, seguida de la formación de vesículas y la consecuente liberación de enzimas acrosomales que facilitan la penetración del espermatozoide a través de la zona pelúcida.

Aunque se dispone de importantes avances en el conocimiento de la capacitación y de la reacción acrosomal, aún falta precisión en algunos pasos de estos procesos, especialmente sobre aquellos que tienen que ver con los cambios que deben ocurrir en la conformación de las membranas espermáticas para ocasionar la fusión entre ellas y la liberación de enzimas acrosomales. Estudios muy recientes (Gadella y Harrison, 2000; Gadella, 2002; Gadella et al., 2003.) sugieren que existe un cambio en la arquitectura de los fosfolípidos de la membrana en espermatozoides capacitados.

En experimentos realizados con fantasmas de eritrocitos se ha demostrado que un paso fundamental para la formación de vesículas membranales es la pérdida de la asimetría fosfolipídica de la membrana plasmática. La traslocación de



fosfatidilserina, de la cara interna a la externa, le confiere a las membranas propiedades de fusión, por ende, la presencia de este fosfolípido en la cara externa de la membrana es considerado parte esencial del mecanismo por el cual la pérdida de la asimetría fosfolípídica de la membrana le confiere a ésta propiedades fusogénicas.

Partiendo de estos conocimientos en el presente estudio nos propusimos investigar si la membrana plasmática del espermatozoide experimenta pérdida en la asimetría de sus fosfolípidos durante los procesos de capacitación y de reacción acrosomal. Para ello se trabajó con espermatozoides de cola de epidídimo de conejo. Se estudió por citometría de flujo la fijación específica de la Anexina (unida a un marcador fluorescente, Anexina V-FITC) a la fosfatidil-serina expuesta en la cara externa de la membrana plasmática de la cabeza de los espermatozoides en diferentes momentos de la capacitación y durante la reacción acrosomal inducida en forma experimental con A23187 y Progesterona.

El aumento en la concentración de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana a través de su unión específica con la Anexina (Stuart et al.,1998) constituye una excelente demostración experimental de los cambios en la simetría de la membrana que acompañan a la capacitación y a la reacción acrosomal.

Considerando, además, que la membrana plasmática del espermatozoide tiene una organización heterogénea, basada en dominios, se determinó que, si esta pérdida de la simetría era demostrada en los estudios de citometría de flujo, se precisaría la distribución topológica diferencial de la Anexina fijada a regiones precisas de la estructura anatómica de la cabeza del espermatozoide, recurriendo para ello a las ventajas que proporciona la utilización de la microscopía confocal.

En todos los experimentos se recurrió al uso del yoduro de propidio para descartar la presencia de espermatozoides no viables o bien, que ya hayan sufrido la reacción acrosomal.

## **VI.- Hipótesis.**

Los procesos de capacitación y de reacción acrosomal provocados experimentalmente en el espermatozoide de cola de epidídimo de conejo, comprenden una pérdida importante en la asimetría de los fosfolípidos de la membrana plasmática

## **VII.- Objetivo general.**

Estudiar la ocurrencia de cambios en la asimetría fosfolipídica, de la membrana plasmática de espermatozoides de cola de epidídimo de conejo durante los procesos de capacitación y reacción acrosomal inducidos *in vitro*.

## **VIII.- Objetivos particulares.**

Detectar la ocurrencia y temporalidad de la pérdida de la asimetría de la membrana plasmática del espermatozoide de conejo durante la capacitación y la reacción acrosomal.

Conocer la distribución topológica de la asimetría fosfolipídica de la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide de conejo durante la capacitación y la reacción acrosomal.

## **IX.- Material y métodos.**

**Reactivos:** Clorotetraciclina (CTC), Azul Brillante de Coomassie G-250 (CBB), HEPES (N-(2-hidroxi-etil) piperazin-N'-(2- ácido etanosulfónico), piruvato de sodio, Tris (tris-(hidroxi-metil) aminometano), lactato de sodio, D-(+) glucosa, percoll, albúmina de suero bovina (libre de ácidos grasos) así como otras sales, las cuales fueron de la marca Sigma Chemical Co (St. Louis, Missouri, USA); ionóforo de calcio A23187 (Boheringer-Mannheim, Germany). Todos los demás reactivos fueron de grado analítico. La solución stock de Progesterona y A23187 fueron preparadas en dimetilsulfoxido (DMSO), su almacenamiento y uso fue como lo indica Roldan et al., (1994) y por Köhn et al., (1997), respectivamente. La concentración final de DMSO es de 0.1 %, y el procesamiento de las muestras controles sin A23187 ni progesterona, contenían la concentración apropiada de DMSO.

Se utilizaron conejos machos Nueva Zelanda Blancos, sexualmente maduros, con fertilidad probada. Se usaron animales de entre 12 a 24 meses con un peso corporal de entre 3 y 4 Kg. Los animales permanecieron en el bioterio, disponiendo de alimento y agua *ad libitum*, temperatura controlada de 18°C y ciclos de luz oscuridad de 12 x 12 horas.

### **Obtención de muestras.**

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical, después los testículos fueron disecados, se ligaron las venas y el conducto del epidídimo con hilo de algodón y se procedió a perfundir el paquete vascular con 5 ml de Solución Salina Fisiológica NaCl 0.9 M, pH 7.4 a 37°C, con el propósito de evitar la contaminación de las muestras con sangre. Posteriormente se separaron los epidídimos de los testículos y se disecaron las caudas. Los espermatozoides de esta región se obtuvieron por

perfusión, introduciendo una cánula por el conducto deferente y dejando correr 3 ml de medio A. La suspensión de espermatozoides se pasó a través de un gradiente de Percoll discontinuo (95-75% diluido en medio Brackett modificado sin  $\text{Ca}^{2+}$  (medio A) (30 mM HEPES, 5 mM KCl, 100 mM NaCl, 21 mM lactato de sodio, 2.5 mM piruvato de sodio, ajustado a un pH 7.6) (Suárez et al., 1986), centrifugándolos a 900 x g por 20 min. Posteriormente los espermatozoides fueron recuperados de la interfase del gradiente y lavados por centrifugación en medio A, a 500 x g por 5 min.

### **Procesamiento de las muestras.**

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

En principio, el porcentaje de espermatozoides vivos se obtuvo usando la técnica de tinción supravital Eosina-Nigrosina (Swanson, et al., 1951), con esta tinción los espermatozoides muertos adquieren una coloración roja mientras que los vivos no se tiñen. Posteriormente se verificó la viabilidad por citometría de flujo haciendo uso de un fluorocromo (ioduro de propidio). En este estudio sólo se consideraron las muestras con un porcentaje de espermatozoides vivos superior al 80% y una buena movilidad la cual se calificó por observación directa al microscopio.

### **Capacitación.**

Para la inducción de la capacitación de los espermatozoides ya seleccionados y lavados se resuspendieron en el Medio Brackett modificado (medio capacitante A)

(30 mM HEPES, 5 mM KCl, 84 mM NaCl, 21 mM lactato de sodio, 2.5 mM piruvato de sodio, 13.9 mM, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, glucosa, 1 mg/ml de albúmina de suero bovino, ajustado a un pH 7.6), a una concentración final de  $2.5 \times 10^7$  espermatozoides/ml (La concentración espermática se calculó contando los espermatozoides en un hemocitómetro (cámara de Neubauer). Las suspensiones espermáticas se realizaron en tubos cónicos de polipropileno, se incubaron en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> / 95% aire durante 6 h a 37°C con agitación constante. Cada 2 horas se tomó una muestra de 20 µl para realizar el estudio citométrico. A las 6 horas de incubación, se tomaron dos alícuotas de 25 µl para medir el porcentaje de espermatozoides vivos por el método de eosina/nigrosina y en otra alícuotas de 25 µl se cuantificó el porcentaje de espermatozoides capacitados, mediante la tinción de clorotetraciclina (CTC) (Green et al., 1994). La fluorescencia de la clorotetraciclina unida al espermatozoide de conejo y el porcentaje de espermatozoides capacitados en diferentes tiempos fueron similares a los previamente reportados por otros investigadores (García-Macedo et al., 2001). Los espermatozoides capacitados fluorescieron particularmente en la región acrosomal anterior.

### **Reacción acrosomal.**

Después de las 6 horas de capacitación se tomaron tres alícuotas de 300 µl cada una. Una se trató con ionóforo de calcio A-23187 (Sigma) 10µM final con 0.1% de concentración final, otra con Progesterona (Sigma) (3.18 µM concentración final en DMSO 0.1%) (Sabeur K et al., 1996) y la tercera alícuota fue usada como control por lo cual no se le adicionó ningún inductor. Las muestras se incubaron durante 5, 15, 30 y 45 min y para cada tiempo se tomaron alícuotas de 20µl para el análisis citométrico. Para verificar la reacción acrosomal en los espermatozoides incubados

en las condiciones mencionadas, en una de cada cinco muestras con 45 min de incubación post-tratamiento, se realizó la tinción de azul brillante de Coomassie (CBB) (García-Macedo et al., 2001; Miller et al., 1993). La tinción azul de la región del acrosoma indica espermatozoides intactos o no reaccionados. Cuando se observa una disminución importante en la región acrosomal, los espermatozoides se consideraron reaccionados.

### **Estudio citométrico.**

Los cambios inducidos en la asimetría de la membrana plasmática durante la capacitación y la reacción acrosomal fueron evaluados por citometría de flujo, haciendo uso de un estuche comercial de Anexina-V (Anexina-V Fluos, Boheringer Mannheim número de catálogo 1828681) conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Esta proteína sirve para detectar la translocación de fosfatidilserina de la lámina interior a la exterior de la membrana plasmática. Se hicieron ligeras modificaciones en el procedimiento recomendado. Se tomó una alícuota de 20  $\mu$ l (150,000 células) de la muestra y se le adicionó 1  $\mu$ l de IP (50  $\mu$ g/ml), para valorar la viabilidad de los espermatozoides, para detectar la exposición de fosfatidilserina en el espermatozoide se adicionó a cada muestra 20  $\mu$ l de Anexina-V (10  $\mu$ g/ml) en buffer de unión (10 mM Hepes/NaOH, pH 7.4 140 mM NaCl, 5mM CaCl<sub>2</sub>). Las muestras se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad, posteriormente las muestras se analizaron en un citómetro de flujo FACSort (Becton Dickinson System, San José, CA). El valor de FSC-H fue de 44 y el de FSC E00.

La intensidad de fluorescencia emitida a 530 nm (FL1, correspondiente a Anexina V) y a 610 nm (FL2, correspondiente a IP) fue medida en 10 000 espermatozoides

(Alonso-Pozos et al., 2003) y analizada con el programa Lysys II. Los datos de fluorescencia de las células se obtuvieron en una gráfica en la que se registró la FL2 logarítmica en el eje de las “y” y la FL1 en el de las “x”. De esta manera se formaron 4 cuadrantes en la grafica: inferior izquierdo (negativo para ambas fluorescencias); inferior derecho (positivo a FL1, negativo a FL2); superior izquierdo (negativo a FL1, positivo a FL2) y en el cuadrante superior derecho (positivas a FL1 y FL2). Las células que resultaron positivas a FL 2 fueron eliminadas del experimento. Posteriormente se obtuvieron histogramas para representar la intensidad de la fluorescencia 1 (FL1) de todas las muestras.

### **Microscopia confocal.**

Para la microscopia confocal, las muestras se marcaron con el fluorocromo de manera similar a la seguida para citometría de flujo, posteriormente se realizó un frotis en un porta objetos (3 000 spz/ml), se colocó el cubre objetos y se procedió a realizar el análisis de microscopia, para lo cual se usó un microscopio Zeiss Axiovert 100 M, usando 488 y 505 nm de excitación y emisión >560nm para detectar Anexina-V FITC e IP respectivamente. Sólo se consideraron para los resultados las muestras que no incorporaron IP y que fueron positivas a Anexina-V. Durante el análisis de microscopia se seleccionaron diferentes campos y las imágenes fueron gravadas, es preciso señalar que en algunos espermatozoides se procedió a hacer un barrido para corroborar que solo tenían fluorescencia a Anexina V FITC. Las imágenes fueron analizadas posteriormente haciendo uso de un programa de computadora el LSM 5 Image Browser para microscopia confocal.

### **Análisis estadístico.**



Para el análisis estadístico se usó el paquete Sigma Stat v2.0 (Sigma-Aldrich Co., San Louis, Missouri, USA). Los datos se analizaron con ANOVA de dos vías y prueba t de Student. El valor de significancia fue  $p < 0.05$ .

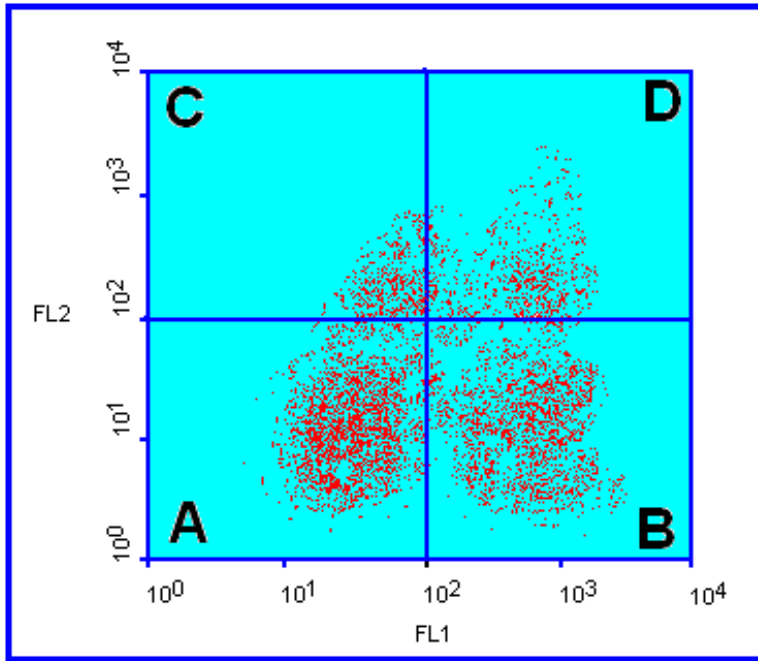
## **X.- Resultados.**

En la figura 1 se presenta un ejemplo típico de una gráfica de puntos de los resultados obtenidos, empleando citometría de flujo. En el eje de las abscisas se representa la intensidad de fluorescencia emitida por la Anexina V-FITC (Fluorescencia 1) y en el eje de las ordenadas la intensidad de fluorescencia emitida por el IP (Fluorescencia 2). Para el análisis de los datos, la gráfica de puntos se dividió en cuatro cuadrantes. El cuadrante A se presentan los espermatozoides negativos tanto a IP como a Anexina V-FITC (dobles negativos), el cuadrante B el porcentaje de espermatozoides positivos únicamente a Anexina V-FITC, el cuadrante C representa el porcentaje de células positivas únicamente a IP y por último tenemos al cuadrante D en el que se observa el porcentaje de espermatozoides positivos tanto a IP como a Anexina V-FITC (Dobles positivos).

En todos los experimentos el porcentaje de espermatozoides registrados en los cuadrantes A y B fue siempre superior al de los otros dos cuadrantes, tanto en condiciones de capacitación como en las de reacción acrosomal (RA), de tal forma que los espermatozoides con fluorescencia 2 (cuadrante C y D), en ningún caso excedió el 15% de los espermatozoides de todas las muestras.

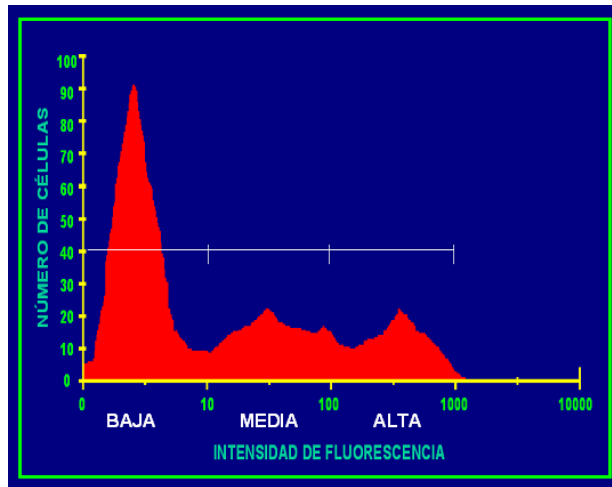
El análisis experimental de la fluorescencia emitida por la Anexina V-FITC unida a espermatozoides (Fluorescencia 1), se realizó mediante histogramas (figura 2) en los cuales, se puede observar de manera clara la existencia de tres poblaciones de células con distintas intensidades de fluorescencia.

Figura 1.



Gráfica de puntos para análisis de los datos obtenidos por citometría de flujo de los espermatozoides marcados con Anexina-FITC. En el eje de las ordenadas se representa la intensidad de fluorescencia 1 (fluorescencia emitida por el IP) y en el eje de las abscisas la intensidad de fluorescencia 2 (Fluorescencia emitida por la Anexina V-FITC). Para el análisis de los datos, la gráfica de puntos fue dividida en cuatro cuadrantes de acuerdo a lo mencionado en el texto.

FIGURA 2



*Histograma típico para el análisis citométrico, se presentan tres regiones con diferentes intensidades de fluorescencia. La primera corresponde a aquellos espermatozoides que no presentaron cambios en las propiedades asimétricas de la membrana y por lo tanto no unieron Anexina (Intensidad de fluorescencia baja < 10). Segunda intermedia (Intensidad de fluorescencia media >10 y <100), en la que la pérdida de la asimetría se vio incrementada y una tercera región con la mayor intensidad de fluorescencia (Intensidad de fluorescencia alta >100), relacionada con una alta cantidad de fosfatidilserina expuesta en los espermatozoides.*

La primera corresponde a aquellos espermatozoides que no presentaron cambios en las propiedades asimétricas de la membrana y por lo tanto no unieron Anexina (Intensidad de fluorescencia baja  $<10$ ). Una población con intensidad intermedia (Intensidad de fluorescencia media  $10 > <100$ ) y una tercera población con la mayor intensidad de fluorescencia (Intensidad de fluorescencia alta  $>100$ ) relacionada con una alta cantidad de fosfatidilserina expuesta en la cara externa de la membrana de los espermatozoides (figura 2).

Se observaron variaciones significativas en las distintas subpoblaciones en relación con el tiempo de capacitación, las cuales son más evidentes a partir de las 4 horas de incubación. Los principales cambios fueron: una disminución en el porcentaje de espermatozoides con intensidad de fluorescencia baja y un aumento significativo en el porcentaje de espermatozoides con intensidad de fluorescencia alta especialmente después de 4 horas de incubación. Esto significa que existe una importante exposición de fosfatidilserina en la cara externa en todos los tiempos de incubación pero con un aumento significativo a las 4 horas de incubación en el medio capacitante (tabla 1, figura 3). Cabe señalar que en cuanto a la distribución de la fluorescencia de acuerdo a la intensidad, a las 6 horas de incubación la población espermática se acumuló en el canal de mayor intensidad. En cuanto a la tinción con clorotetraciclina, se encontró que a las 6 horas de incubación con el medio capacitante una gran mayoría ( $71\% \pm 6$ ) de los espermatozoides habían alcanzado la capacitación.

**TABLA 1**

Intensidad de fluorescencia de Anexina-V-FITC en espermatozoides incubados en medio capacitante A.

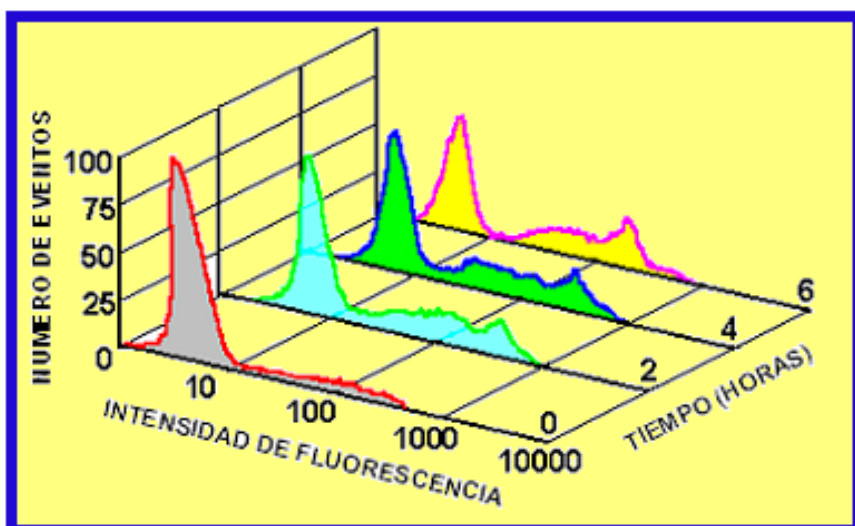
Tiempo (Horas)	n	Fluorescencia roja	Intensidades de Fluorescencia FL1 (promedio +/- desviación estándar)		
			(1-10)	(10 -100)	(>100)
0	5	8 ± 2.4	*78.4 ± 3.1 <sup>a</sup>	**12.0 ± 2.0 <sup>a</sup>	**10.6 ± 4.3 <sup>a</sup>
2	5	10 ± 3.2	*68.6 ± 6.7 <sup>a</sup>	**16.2 ± 2.1 <sup>b</sup>	**15.2 ± 3.2 <sup>a</sup>
4	5	11 ± 3.1	*64.2 ± 6.5 <sup>b</sup>	**17.6 ± 0.9 <sup>b</sup>	**18.2 ± 4.0 <sup>a,b</sup>
6	5	13 ± 4.0	*59.6 ± 7.3 <sup>b</sup>	**18.4 ± 4.8 <sup>b</sup>	**24.0 ± 3.4 <sup>c</sup>

n = número de casos

<sup>a-g</sup> Diferentes letras indican diferencia estadística significativa (p<0.05) entre los datos de la misma columna. Prueba ANOVA plus y Tukey.

\*\*\*,\*\*\* Diferente número de asteriscos indican diferencia estadística significativa (p<0.05) entre los datos del mismo renglón. Prueba t de Student.

Figura 3.



*Análisis de citometría de flujo de Anexina V-FITC unida a espermatozoides, por histogramas, en espermatozoides durante el proceso de capacitación.*

En el estudio citométrico durante el proceso de reacción acrosomal, en las muestras del grupo control sólo se observó una disminución estadísticamente significativa en la intensidad de fluorescencia baja a partir de los 30 minutos de incubación. En los espermatozoides incubados en presencia de progesterona, se observa una drástica y estadísticamente significativa caída en el porcentaje de espermatozoides con intensidad de fluorescencia baja, a los 15 minutos de incubación y consecuentemente un aumento significativo en el porcentaje de células con mayor intensidad. Aunque los cambios en la intensidad de fluorescencia baja en los tiempos de 30 y 45 minutos no mostraron cambios significativos, el porcentaje de células con la mayor intensidad de fluorescencia sí aumentó significativamente con respecto al tiempo.

Los espermatozoides incubados en presencia de A23187 presentaron, en relación directa con el tiempo de incubación transcurrido, una disminución estadísticamente significativa en el porcentaje de espermatozoides con fluorescencia baja, no hubo cambios significativos en el número de espermatozoides con intensidad media y hubo un aumento significativo con respecto al tiempo de incubación en el porcentaje de células con intensidad de fluorescencia alta.

En general se observó que en los tres tratamientos se presentó una disminución en el porcentaje de espermatozoides con intensidad de fluorescencia baja, sin embargo, hubo diferencias importantes entre los tratamientos. Se encontró que en los espermatozoides capacitados incubados sin ningún inductor de la reacción acrosomal, los cambios principales ocurren únicamente al final del periodo de incubación. Durante la incubación con progesterona el cambio principal ocurre entre los 15 y los 30 minutos, de tal forma que ya no hay cambios significativos en los tiempos posteriores; con el ionóforo al igual que como en la progesterona, los cambios se inician a los 15 minutos, pero continúan con la misma tendencia en los tiempos posteriores (tabla 2 y figura 4).



**TABLA 2**

Intensidad de fluorescencia de Anexina-V-FITC en espermatozoides durante la reacción acrosomal (sólo los cuadrantes con baja o nula fluorescencia roja fueron incluidos) media +/- desviación estándar.

Inductor de RA.	Tiempo	n	Intensidades de Fluorescencia verde		
	(min.)		(0-10)	(10-100)	(>100)
Sin inductor	5	5	*69.0 ± 4.4 <sup>a</sup>	**20.2 ± 3.4 <sup>a</sup>	**11.8 ± 5.9 <sup>a</sup>
Sin inductor	15	5	*65.6 ± 3.6 <sup>a</sup>	**20.6 ± 2.6 <sup>a</sup>	**15.8 ± 4.1 <sup>a</sup>
Sin inductor	30	5	*58.6 ± 2.3 <sup>b</sup>	**19.2 ± 1.9 <sup>a</sup>	**22.2 ± 3.1 <sup>b</sup>
Sin inductor	45	5	*53.6 ± 4.4 <sup>b</sup>	**17.6 ± 1.7 <sup>a</sup>	***29.8 ± 3.9 <sup>c</sup>
Progesterona	5	5	*60.2 ± 5.2 <sup>a,b</sup>	**15.2 ± 4.2 <sup>a</sup>	***34.6 ± 1.5 <sup>d</sup>
Progesterona	15	5	*30.0 ± 1.6 <sup>c</sup>	**24.4 ± 3.6 <sup>a</sup>	***45.8 ± 4.1 <sup>e</sup>
Progesterona	30	5	*26.8 ± 5.2 <sup>c</sup>	*20.6 ± 3.2 <sup>a</sup>	**55.6 ± 6.9 <sup>f</sup>
Progesterona	45	5	*16.6 ± 5.4 <sup>c</sup>	*23.0 ± 6.2 <sup>a</sup>	**62.4 ± 2.3 <sup>f</sup>
A23187	5	5	*58.6 ± 6.4 <sup>a</sup>	**24.4 ± 5.8 <sup>a</sup>	**20.0 ± 2.9 <sup>b</sup>
A23187	15	5	*38.6 ± 3.1 <sup>e</sup>	**25.6 ± 4.5 <sup>a</sup>	*36.2 ± 3.9 <sup>d</sup>
A23187	30	5	*22.6 ± 6.9 <sup>c,d</sup>	*18.8 ± 7.8 <sup>a</sup>	**59.6 ± 3.5 <sup>f</sup>
A23187	45	5	*13.4 ± 8.6 <sup>d</sup>	*21.0 ± 8.3 <sup>a</sup>	**69.6 ± 3.4 <sup>g</sup>

n = número de casos

<sup>a-g</sup> Diferentes letras indican diferencia estadística significativa (p<0.05) entre los datos de la misma columna. Prueba ANOVA plus Tukey.

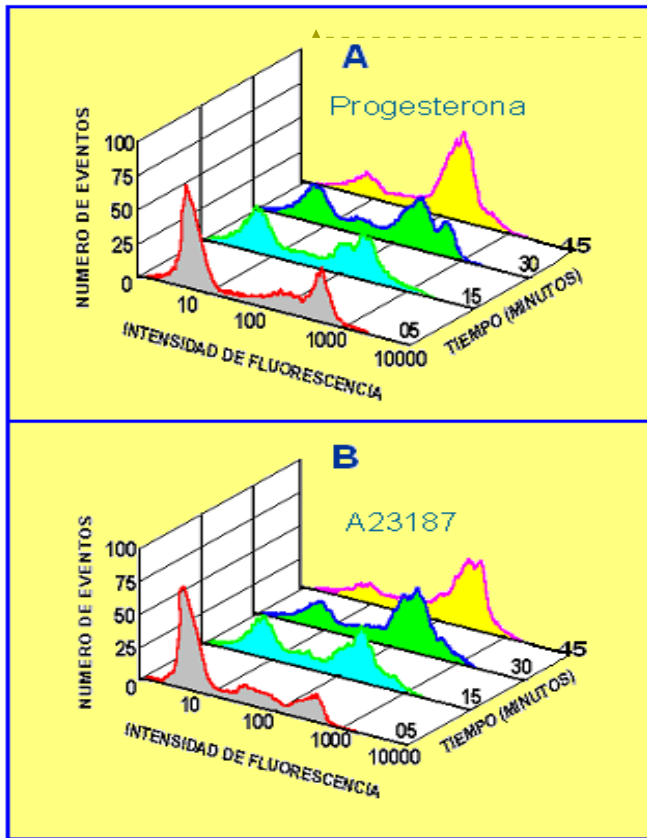
\*\*\*,\*\*\* Diferente número de asteriscos indican diferencia estadística significativa (p<0.05) entre los datos del mismo renglón. Prueba t de Student.

El patrón de intensidad de fluorescencia de espermatozoides incubados en presencia de progesterona mostraron de forma particular una curva bifásica entre los 5 y los 15 minutos después de la incubación con la hormona (figura 4A), esta característica bifásica se perdió a los 45 minutos de incubación. En el caso de los espermatozoides inducidos en presencia del ionóforo nunca se observó esta característica (figura 4B).

La evaluación de la reacción acrosomal con azul de Coomassie de los espermatozoides capacitados e inducidos a la RA con progesterona, A23187 y sin inductor, dieron como resultados los siguientes porcentajes de espermatozoides reaccionados:  $34 \pm 5$ ,  $30 \pm 4$  y  $5.3 \pm 2$  respectivamente a los 45 minutos de incubación (figura 5). Las diferencias entre los tres grupos sólo fueron significativas al comparar los inductores con respecto al control.

En cuanto a los resultados de microscopía confocal, en primera instancia se escanearon todas las muestras observadas al microscopio (figura 6) y solamente aquellas que no mostraron fluorescencia roja (línea inferior de la figura 6), se consideraron en el análisis.

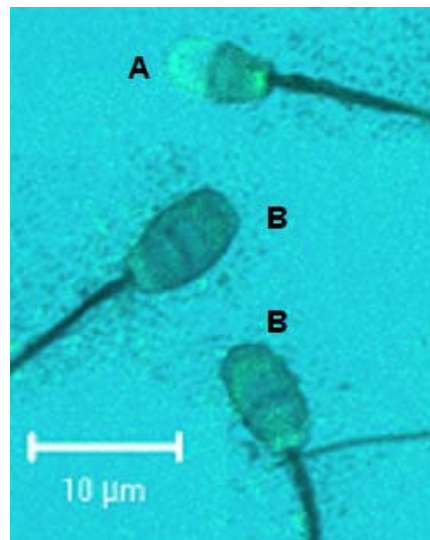
Figura 4.



Con formato: Fuente: Arial, Color de fuente: Negro

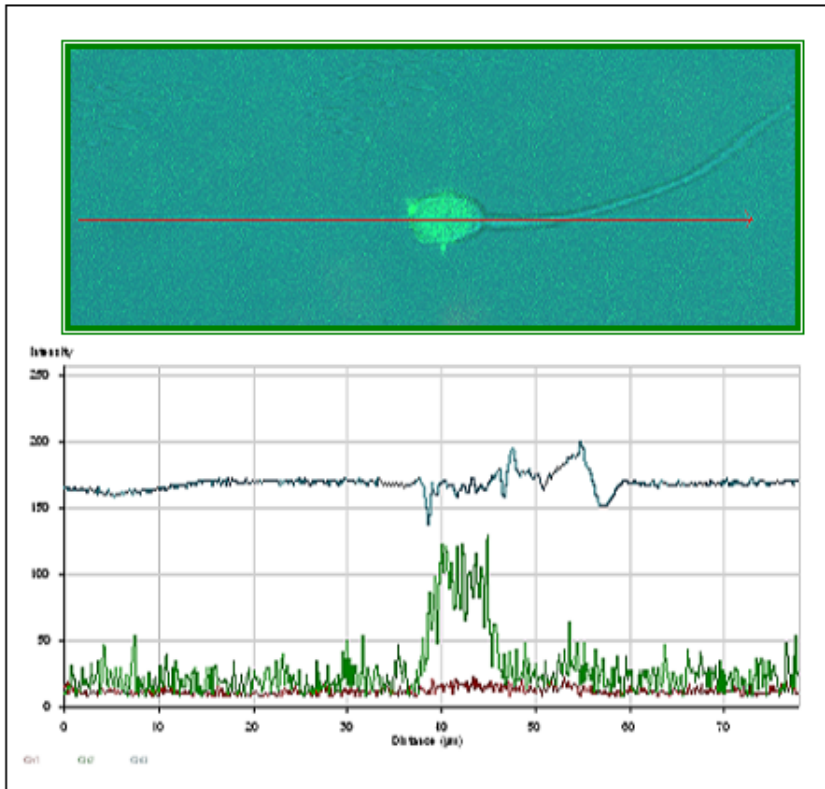
Análisis de citometría de flujo de Anexina V-FITC unida a espermatozoides, por histogramas, en espermatozoides capacitados durante la reacción acrosomal con progesterona (A) y con A-23187 (B). Se observan de manera fehaciente tres subpoblaciones distintas en intensidades de fluorescencia. La primera subpoblación corresponde a aquellos espermatozoides que no presentaron cambios en las propiedades asimétricas de la membrana y por lo tanto no unieron Anexina (Intensidad de fluorescencia baja <math>< 10</math>). Una segunda población intermedia (Intensidad de fluorescencia media <math>> 10</math> y <math>< 100</math>), en la que la pérdida de la asimetría fue mayor, y una tercera población con la mayor intensidad de fluorescencia (Intensidad de fluorescencia alta <math>> 100</math>), relacionada con una alta cantidad de fosfatidilserina expuesta en los espermatozoides.

**Figura 5**



*Fotografía de espermatozoides de cola de epidídimo de conejo teñidos con azul de Coomassie para la detección de reacción acrosomal. La tinción azul de la región del acrosoma indica espermatozoides intactos o no reaccionados (B). Cuando se observa una disminución importante en la coloración en la región acrosomal, los espermatozoides se consideraron reaccionados (A).*

Figura 6.

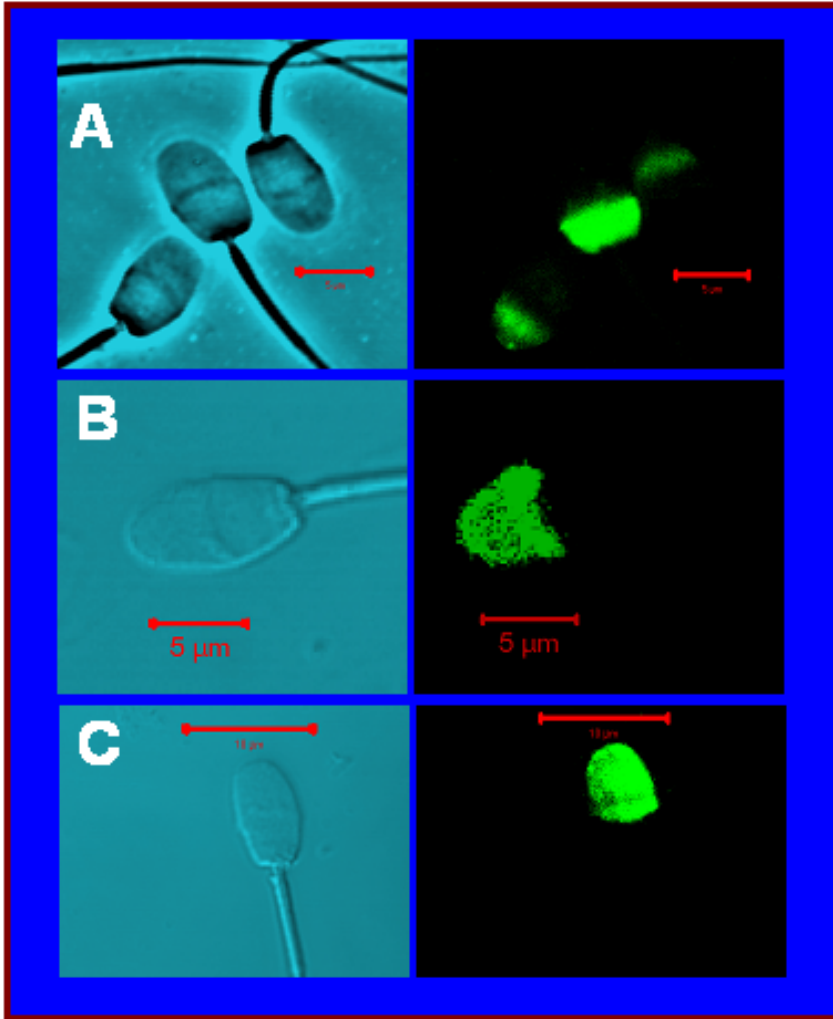


Escáner típico de microscopía confocal con intensidad de fluorescencia roja y verde, en espermatozoides capacitados con inducción de reacción acrosomal con A-23187. La intensidad de fluorescencia verde (Anexina- FITC) es indicada en la gráfica con una línea irregular, que se ve aumentada, cuando el escáner analiza la cabeza del espermatozoide. La fluorescencia roja (IP) se representa por una línea con niveles de intensidad constante a lo largo del escáner del espermatozoide.

En condiciones de capacitación, después de 6 horas de incubación, la fluorescencia (unión de Anexina-V a fosfatidilserina) se observó básicamente en la región post-acrosomal de la cabeza de los espermatozoides (figura 7A), lo cual indica que en esta región los cambios en la asimetría membranal son más evidentes y probablemente desempeñen alguna función en los pasos posteriores del proceso de fertilización.

El carácter bifásico de la intensidad de fluorescencia en los espermatozoides con reacción acrosomal inducida con progesterona, puede estar relacionado con la tinción diferencial en la cubierta acrosomal, la cual se observó por microscopia confocal. En la figura 7B se muestran claramente dos bandas de fluorescencia de intensidades diferentes cuando los espermatozoides fueron inducidos para la reacción acrosomal con progesterona. Una banda brillante en el límite ecuatorial de la región acrosomal y una débil en todo el resto del acrosoma. Por el contrario, la acción del ionóforo A23187 (figura 7C) sobre el espermatozoide induce fluorescencia homogénea a través de toda la región acrosomal, y una fluorescencia pequeña en la región postacrosomal en la cabeza del espermatozoide.

Figura 7



Composición fotográfica de espermatozoides capacitados (7A), reaccionados con progesterona (7B) y con A-23187 (7C). En la fotografía 7B se muestran claramente dos bandas de fluorescencia de intensidades diferentes cuando los espermatozoides fueron inducidos para la reacción acrosomal con progesterona. Una banda brillante en el límite ecuatorial de la región acrosomal y una débil en todo el resto del acrosoma. Por el contrario la acción de A23187 (figura 7C) sobre el espermatozoide induce fluorescencia homogénea a través de toda la región acrosomal, y una fluorescencia pequeña en la región postacrosomal en la cabeza del espermatozoide.

## XI.- Discusión.

Los procesos más importantes para que un espermatozoide adquiera la capacidad para fertilizar exitosamente al ovocito son: maduración epididimaria, capacitación y reacción acrosomal. Fisiológicamente el primero acontece durante el transcurso de los espermatozoides por el epidídimo, mientras que los dos últimos ocurren después que el espermatozoide ha sido eyaculado dentro del tracto reproductor femenino. Una vez que los espermatozoides progresan dentro del conducto epididimario hasta llegar a la región conocida como cola de epidídimo, se consideran igualmente maduros que los eyaculados y son potencialmente fértiles. Sin embargo los espermatozoides de epidídimo no tienen componentes adquiridos del plasma seminal que pudieran alterar su capacitación (Yanagimachi, 1994). En un estudio reciente (Harkema et al., 2004), se encontró que un mayor porcentaje de espermatozoides obtenidos de cola de epidídimo llegó a la capacitación en 6 horas de incubación en condiciones capacitantes cuando se compararon con espermatozoides eyaculados incubados bajo las mismas condiciones.

Estas diferencias confieren cierta ventaja, en cuanto al tiempo necesario para alcanzar la capacitación, a los espermatozoides de cola de epidídimo sobre los espermatozoides de eyaculado. Dicha ventaja prosigue durante la reacción acrosomal (García-Macedo et al., 2001), resultados que hay que tomar cuidadosamente en cuenta al analizar nuestros resultados puesto que nuestros experimentos se realizaron con espermatozoides de cola de epidídimo.

Durante el proceso de capacitación se han detectado cambios a nivel de la membrana plasmática del espermatozoide como son: eliminación gradual o alteración de glicoproteínas, modificaciones en la fluidez de la membrana plasmática debidas a una reducción del colesterol membranal y cambios en la distribución y



composición de los fosfolípidos estructurales de la membrana (Yanagimachi, 1994; Muller et al., 1996; Nolan et al., 1995; Gadella et al., 1999). Estudios más recientes realizados con la adición de fosfolípidos sintéticos a espermatozoides suspendidos en un medio capacitante con  $\text{NaHCO}_3$  permitieron a algunos investigadores proponer que durante la reacción acrosomal ocurren cambios en la distribución de los fosfolípidos en la membrana espermática (Gadella et al., 1999; Gadella y Harrison, 2000 y Frits et al., 2001).

Nuestros resultados apoyan esta idea, indicando que durante el proceso de capacitación aumenta la concentración de fosfatidilserina expuesta en la cara externa de la membrana plasmática del espermatozoide. Este cambio en la disposición de fosfolípidos en la superficie de la célula espermática se continúa, haciéndose más evidente, durante el proceso de reacción acrosomal.

Los componentes fosfolipídicos de la membrana plasmática de los espermatozoides, igual que en otras células, se encuentran asimétricamente distribuidos. Diversos métodos han revelado que los fosfolípidos como esfingomielina (SM) y en menor grado fosfatidilcolina (PC), se encuentran principalmente en la cara externa de la membrana (Gadella et al., 1999 y Muller et al., 1996). Mientras que los aminofosfolípidos como fosfatidiletanolamina (PE) y especialmente la fosfatidilserina (PS) están localizados en la capa lipídica interna (Rana et al, 1993; Hinkovska et al., 1986).

La exposición de fosfatidilserina y la consecuente pérdida de la asimetría membranal ha sido detectada en numerosos casos de células somáticas utilizando la afinidad que tiene la Anexina-V por este fosfolípido (Koopman et al., 1994; Vermes et al., 1995).

La Anexina-V es un miembro de una familia de proteínas con actividad anticoagulante vascular que presentan afinidades específicas por el calcio iónico y por algunos fosfolípidos. Esta proteína se ha llamado de diferentes maneras: Proteína de placenta 4 (PP4), proteína anticoagulante de placenta I (PAP I), calfibindina I (CPB-I), proteína fijadora de fosfolípidos dependiente de calcio 33 (CaBP33), proteína vascular anticoagulante alfa (VACa), ancorina CII, lipocortina-V, endonexina II e inhibidor de la tromboplastina. Esta proteína, como ya dijimos, presenta una alta especificidad por la fosfatidilserina cuando se encuentra en condiciones fisiológicas de concentración de  $Ca^{2+}$ .

Una propiedad muy útil de la Anexina V unida a un fluorocromo como el isotiocianato de fluoresceína (Anexina V –FITC) en este tipo de estudios se deriva del hecho de que puede unirse a un gran número de sitios de fijación en las superficies celulares proporcionando una señal fluorescente de gran intensidad. El número de sitios de fijación para la anexina V ha sido señalado como de  $6 - 24 \times 10^6$  por célula en las células tumorales que presentan alteraciones en la distribución de sus fosfolípidos membranales (Sugimura et al., 1994) y de  $8.8 \times 10^6$  por célula en las células de estirpe endotelial (van Heerde et al., 1994). Los eritrocitos humanos normales pueden tener tan pocos como 276 sitios de fijación (Tait and Gibson, 1994), o tantos como 5000 (Sun et al., 1993). Este número puede aumentarse notablemente cuando la fosfatidilserina, usualmente presente sobre todo en la capa interna de la membrana plasmática, es translocada a la parte externa de esta misma membrana.

Algunos estudios practicados con liposomas fabricados con fosfatidilserina han demostrado que la estequiometría de fijación de la Anexina V a este fosfolípido

oscila entre 4 a 8 moléculas de Anexina por cada fosfatidilserina (Pigault et al., 1994; Meers and Mealy, 1993). Esto también refleja la tendencia que tiene la Anexina V para formar trímeros en el momento de su fijación a fosfatidilserina aumentando notablemente la intensidad de la fluorescencia producida (Sopkova et al., 1993).

La fijación de la Anexina V a la fosfatidilserina es muy rápida y muy dependiente de la presencia de concentraciones específicas de calcio. Este proceso puede ser reversible por la adición de un quelante del calcio, como el EDTA. La utilidad de utilizar simultáneamente las propiedades tintoriales de la Anexina V y del yoduro de propidio ha sido repetidamente señalada sobre todo en los casos en que se desea mostrar que la fijación de la Anexina V no obedece a alteraciones en la membrana celular que permitan su paso al interior de la célula estudiada. Por ejemplo las células que experimentan el proceso de necrosis se tiñen simultáneamente con la Anexina V y con el PI.

En los resultados obtenidos en este trabajo se demuestra que en las poblaciones de espermatozoides sometidas a condiciones capacitantes *in vitro*, éstos pierden la asimetría fosfolipídica de su membrana plasmática de manera progresiva respecto al tiempo, lo cual se ve reflejado por el incremento en el porcentaje de espermatozoides con intensidad de fluorescencia alta como consecuencia de la unión a Anexina-V FITC. El mayor aumento en la intensidad de fluorescencia ocurrió a partir de las 4 horas de incubación en el medio capacitante A. Este parece ser un cambio temprano en la capacitación, ya que según reportes, la capacitación espermática en el conejo, usando medio Brackett, ocurre en la mayoría de los espermatozoides a las 6 horas (Reyes et al., 1978 y Brackett 1975). Con la tinción de clorotetraciclina realizada en este trabajo pudimos constatar que después

de incubar los espermatozoides durante 6 horas en un medio capacitante, el 71.5%±6.0 de los espermatozoides eran capaces de desarrollar la reacción acrosomal cuando eran estimulados *in vitro* con progesterona o con A23187, dato que coincide con los porcentajes reportados por otros autores en condiciones similares (Reyes et al., 1978; Brackett 1975 y García Macedo, et al 2001).

Los componentes estructurales de la bicapa de la membrana plasmática se encuentran en equilibrio gracias a la acción de diferentes enzimas denominadas translocasas. Se sabe que todos los fosfolípidos difunden pasivamente a través de esta bicapa, pero que lo hacen con una extraordinaria lentitud. Cuando un fosfolípido como fosfatidilserina o fosfatidiletanolamina cambian de posición, éstos son transportados activamente de la cara externa de la membrana hacia la cara interna por la acción de las enzimas denominadas aminofosfolípido translocasas (también llamadas flipasas), las cuales son dependientes de ATP y  $Mg^{2+}$  (Kuypers et al., 1996). Las enzimas capaces de transportar fosfolípidos de la lámina interna a la lámina externa son denominadas “flopasas”. La inhibición de estas enzimas bajo condiciones experimentales o bien en los procesos fisiológicos característicos de la capacitación y la reacción acrosomal favorecen la liberación de colesterol, lo cual aumenta considerablemente la fluidez de la membrana y facilita el movimiento transmembranal de sus fosfolípidos. También se ha visto que el aumento en la permeabilidad de las membranas y la entrada de calcio facilitan el desorden de los fosfolípidos.

Durante el proceso de capacitación bajo condiciones *in vitro*, algunos de los componentes del medio capacitante pueden estimular el movimiento transmembranal de los fosfolípidos y propiciar la pérdida de la asimetría membranal del espermatozoide, tales componentes del medio capacitante son el  $Ca^{2+}$  (Emiliozzi

y Fenichel, 1997; Osheroff et al., 1999), el bicarbonato (Gadella y Harrison, 2000) e indirectamente la albúmina por su capacidad de producir la liberación del colesterol presente en la membrana plasmática del espermatozoide (Langlais y Roberts, 1985; Iborra et al., 2000). La participación de estos componentes en la inducción de la translocación fosfolípida en la membrana plasmática ha sido demostrada frecuentemente en otros tipos celulares.

La pérdida de la asimetría fosfolípida es una importante evidencia de desestabilidad membranal. Aunque se sabe que esta desestabilización puede terminar con la muerte celular también en el caso del espermatozoide (Harrison, 1996), se sabe que éste es un paso esencial en el proceso de fusión de membranas (Gadella y Harrison 2002). En el caso del espermatozoide humano, la incubación de estas células en presencia de bicarbonato/CO<sub>2</sub> causa un rápido cambio en la arquitectura de su membrana plasmática, acompañada de una desestabilización (de Vries et al., 2003). Los resultados de este trabajo apoyan la participación que tienen algunas sustancias en la capacitación ya que con el uso de medio Brackett, el cual contiene todos los inductores de capacitación citados por la literatura en el párrafo anterior, se pudo observar una importante desestabilización en la conformación de la membrana reflejada por la presencia de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana de los espermatozoides desde las 4 horas de incubación.

El Ca<sup>2+</sup> juega un papel muy importante en la maduración epididimaria, en la regulación de la movilidad y, sobre todo, en que el espermatozoide adquiera la capacidad fertilizante, facilitando la capacitación y la reacción acrosomal. Es conocido que el incremento en la concentración del Ca<sup>2+</sup> citosólico, inducido por ionóforo A23187, o por incorporación de Ca<sup>2+</sup> al medio, produce una distribución al azar de los lípidos de la membrana (Williamson et al, 1992). El desorden que se

produce en la membrana ocasiona pérdida de la asimetría de los fosfolípidos y posteriormente la formación de vesículas. La relación entre vesiculación y translocación de fosfolípidos fue apoyada por experimentos que mostraron brotes espontáneos y vesiculaciones en liposomas después de una inducción en la redistribución transmembranal de fosfolípidos (Farge y Deveraux, 1992).

Así como el ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$ , la progesterona tiene una función similar aumentando las concentraciones citosólicas de  $\text{Ca}^{2+}$  en el espermatozoide, lo que desencadena cambios membranales importantes (Thomas y Meizel, 1978). Con los resultados de este trabajo se corrobora la importancia del ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  A-23187 y de la progesterona en la inducción de cambios membranales, siendo estos altamente significativos ( $p < 0.05$ ) en comparación con las muestras que no fueron tratados con alguno de estos dos inductores experimentales de la reacción acrosomal. Al comparar los resultados obtenidos por citometría de flujo entre el ionóforo y progesterona, no observamos diferencias estadísticas ( $p < 0.01$ ), lo que nos indica que estos dos inductores participan de manera similar en cuanto a cambios membranales durante la reacción acrosomal. Según la literatura, la progesterona es un inductor de RA efectivo que al unirse al receptor membranal del espermatozoide le produce una activación rápida del flujo de calcio, igual a lo que ocurre con el ionóforo (Kirkman-Brown et al., 2002).

Cuando se incuban espermatozoides recién obtenidos de cola de epidídimo en presencia de progesterona, este esteroide no estimula la reacción acrosomal, a menos que los espermatozoides hayan pasado previamente por un proceso de capacitación en un medio adecuado (Kirkman-Brown et al., 2002). Aunque este esteroide es capaz de inducir el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  en los espermatozoides no capacitados, sólo los capacitados pueden completar la reacción acrosomal. En los

resultados que aquí se reportan cuando los espermatozoides fueron preincubados (6h) en un medio capacitante (medio A) y por 15 min más con progesterona (3.18 µg/ml), el porcentaje de espermatozoides con cambios en la asimetría de la membrana se vio aumentado en forma significativa, lo cual quiere decir que dado que ya estaban capacitados, la progesterona produjo en ellos no solo el flujo de calcio (no medido en este trabajo) sino también la eversión de fosfatidilserina de la cara interna a la cara externa de la membrana plasmática. Estos resultados son similares a los obtenidos en espermatozoides de bovinos (Therien y Manjunath, 2003)..

Aunque según la literatura, hasta hace poco tiempo se consideraba que la RA en el espermatozoide capacitado inicia cuando éste se une a la zona pelúcida del ovocito, actualmente se ha demostrado que la zona pelúcida no es el único inductor *in vivo* y se ha sugerido que además de las glicoproteínas de la ZP existen otros factores importantes que puede ser responsables de la reacción acrosomal, tal es el caso de las proteínas unidoras de progesterona y la misma progesterona libre. Se ha reportado que la progesterona contenida en el líquido del folículo ovulado, se encuentra en concentraciones que son capaces de inducir la reacción acrosomal en el espermatozoide humano (Meizel y Turner, 1991), en cerdo (Melendres et al., 1994), en ratón (Roldan et al., 1994) y en caballo (Meyer, 1995; Cheng, 1998).

La estimulación de la reacción acrosomal con progesterona, en espermatozoides capacitados ha sido demostrada en varias especies de animales (Kirkman-Brown et al., 2002). En este trabajo se demuestra que en el conejo, la progesterona también fue capaz de producir reacción acrosomal, ya que según reportamos aquí, tanto con la tinción de azul de Coomassie como por la unión

específica de Anexina V-FITC a la membrana acrosomal del espermatozoide se demostró la ocurrencia de la reacción acrosomal.

Alguna alteración fisiológica o patológica en la membrana plasmática de la célula puede ser reflejada en la translocación de fosfatidilserina de la lámina interna a la lámina externa de la membrana plasmática. Dicha translocación puede ser monitoreada por la unión calcio dependiente de la Anexina-V con fosfatidilserina, la cual ha sido descrita en los estadios tempranos de apoptosis (Koopman et al., 1994). En el espermatozoide esto debe de considerarse con cuidado, ya que cambios en la composición lipídica y translocación de fosfatidilserina, son sólo parte de los cambios fisiológicos que se producen durante la capacitación, reacción acrosomal y fusión entre células (Gadella et al., 1999; Travis y Kopf, 2002; de Vries et al., 2003).

En los estudios de Gadella y Harrison (2002), sus experimentos no muestran evidencias de que la exposición de fosfatidilserina detectada por la unión a Anexina-V esté relacionada con el proceso de apoptosis en espermatozoides reaccionados con progesterona o con A23187. Al contrario, durante la capacitación y la reacción acrosomal ocurren cambios en la asimetría fosfolipídica que parecen ser eventos fisiológicos importantes del espermatozoide en su camino a la fertilización del ovocito.

Una cantidad significativa de uniones de Anexina en la región post-acrosomal de la membrana plasmática del espermatozoide durante la capacitación, indica que algunas modificaciones a nivel de la arquitectura de la membrana plasmática ocurren durante este proceso. Esta desestabilización parcial puede ser importante en la preparación del espermatozoide para fusionarse con el oolema después de haber entrado en contacto con la zona pelúcida. Las uniones a Anexina-V en esta región de la cabeza del espermatozoide persisten aun después de la inducción de la



reacción acrosomal con A23187. La progesterona parece tener un efecto contrario ya que la fluorescencia en la región post-acrosomal decrece ligeramente. La mayor cantidad de uniones de Anexina en el límite entre la región acrosomal y la post-acrosomal puede ser un punto de acumulación de efectos para la fusión del espermatozoide con el ovocito. La curva bifásica de la unión de Anexina a las membranas del espermatozoide desaparece en forma progresiva de acuerdo al tiempo de incubación, induciendo quizás un incremento en la participación de espermatozoides que ya han sufrido la reacción acrosomal (Gadella et al., 1999).

Varios componentes han sido identificados como inductores de la reacción acrosomal, como son la progesterona, el ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  A23187 y otros; se sabe que las proteínas de la zona pelúcida del ovocito ovulado, ahora son consideradas como el principal inductor fisiológico *in vivo* (Breitbart y Spungin, 1997; Brucker y Lipford, 1995; de Lamirande et al., 1997; Harrison, 1996; Kopf, 2002; Lin y Kan, 1996 y Travis y Kopf, 2002). La membrana plasmática post-acrosomal tiene una composición de fosfolípidos diferente al revestimiento de la membrana plasmática acrosomal (Lin y Kan, 1996; Travis y Kopf, 2002). Esto sugiere que estas regiones membranales pueden responder en forma diferencial a señales, por lo que pueden funcionar en forma precisa de acuerdo a las necesidades. La región postacrosomal de la membrana del espermatozoide debe sufrir procesos fisiológicos que le permitan la fusión con el oolema.

La membrana plasmática del espermatozoide se caracteriza por estar subdividida en regiones bien delineadas denominadas dominios, los cuales difieren en cuanto a la concentración y distribución de los distintos componentes de la membrana plasmática (fosfolípidos, proteínas, colesterol, carbohidratos etc.) (Frits et al., 2000).

El mayor de los dominios de la membrana plasmática en la cabeza del espermatozoide de la mayoría de los mamíferos está en la región acrosomal (anterior a la cabeza) y en la región postacrosomal (posterior a la cabeza). La membrana plasmática de la región acrosomal puede ser subdividida en: 1.- segmento marginal (segmento apical, banda anterior y/o aro periférico), dominio que se encuentra anterior al margen del acrosoma, 2.-el segmento principal (segmento acrosomal) dominio localizado por encima de la mayor porción del acrosoma y 3.- el segmento ecuatorial (acrosoma posterior) dominio ubicado encima de la parte posterior del acrosoma. El dominio marginal y el segmento principal a menudo son referidos como acrosoma anterior o como capa anterior. Estos dos dominios están separados por una media luna central en el caso de espermatozoides de cobayo y posiblemente de otras especies (Yanagimachi, 1994; Frits et al., 2000).

El dominio de la región postacrosomal (cabeza posterior, segmento postacrosomal), comprende la membrana plasmática entre el margen posterior del acrosoma y el cuello. El margen entre la región acrosomal y postacrosomal puede estar delimitada por el aro subacrosomal. El cual une la cabeza del espermatozoide con el margen posterior del segmento ecuatorial.

El aro posterior (aro nuclear) es la unión entre la cabeza y el tallo. La membrana plasmática del flagelo está separada por la pieza media, dominio que contiene una vaina de mitocondrias y el tallo posterior (pieza principal, tallo distal). Estos dominios están separados por un aro de fibras que son componentes del citoesqueleto del flagelo y parece estar adherido a la superficie interna de la membrana plasmática (Yanagimachi, 1994; Frits et al., 2000).

La inducción *In vitro* de la capacitación y/o la reacción acrosomal con progesterona o con A23187, produce importantes cambios diferenciales en los

subdominios acrosomal y post-acrosomal en la asimetría de la membrana de la cabeza del espermatozoide. Podría parecer que los cambios en la asimetría de los fosfolípidos de las membranas ecuatorial y post-acrosomal intacta son indispensables para la exposición de algunos componentes proteínicos que tienen un papel importante en la fusión de membranas entre el espermatozoide y el ovocito, y que son expuestos después de la capacitación y / o la reacción acrosomal (Bedford, 1998).

Allen y Green, (1995) han encontrado que después de la inducción de la reacción acrosomal con A23187, un grupo de epitopes en el segmento ecuatorial son expuestos y pueden participar en la fusión del espermatozoide y el ovocito. La ecuatorina es una proteína del ecuador del espermatozoide que posiblemente está involucrada en la fusión de los gametos y sólo es detectada después de la reacción acrosomal espontánea o inducida (Manandhar y Toshimori, 2001).

## **XII.- Conclusiones**

1.- La citometría de flujo es una técnica que es capaz de detectar cambios tempranos en la membrana plasmática de los espermatozoides inducidos a experimentar la capacitación y la reacción acrosomal.

2.- Durante el proceso de capacitación y reacción acrosomal, inducidos *in vitro*, existe una pérdida de la asimetría de la membrana plasmática del espermatozoide la cual se presenta de forma topológicamente característica y aparentemente de manera específica en relación con el mecanismo inductor de los procesos estudiados.

3.- Esta distribución topológica específica puede relacionarse con la influencia (y nosotros pensamos que también se presenta de acuerdo al papel funcional) de los dominios característicos de la membrana plasmática del espermatozoide.

4.- Durante la inducción de la reacción acrosomal, la pérdida de la asimetría fue significativamente mayor que durante la capacitación.

5.- No hubo diferencias significativas en la proporción de espermatozoides que perdieron la asimetría de la membrana plasmática cuando se indujo la reacción acrosomal con progesterona o el ionóforo A-23187.

6.-La modificación de la distribución topológica de la fosfatidilserina en la cara externa de la membrana (pérdida de asimetría de la membrana) fue diferente entre espermatozoides a los cuales se les indujo reacción acrosomal con progesterona y aquéllos que fueron inducidos con A-23187, lo cual probablemente significa que los agentes activos estudiados actúan de manera diferente como inductores de la reacción acrosomal.

### XIII.- Bibliografía.

Adeoya-Osiguwa SA., Fraser LR. (1993) A biphasic pattern of Ca<sup>2+</sup> uptake by mouse spermatozoa in vitro correlates with changing functional potential. *J Reprod Fertil*: 99-187.

Ain R, Uma Devi K, Shivaji S, Seshagiri PB (1999). Pentoxifylline-stimulated capacitation and acrosome reaction in hamster spermatozoa: involvement of intracellular signalling molecules. *Mol Hum Reprod*. 1999 Jul;5(7):618-26. PMID: 10381816.

Alonso-Pozos I., Rosales-Torres AM., Ávalos-Rodríguez A., Vergara-Onofre M., Rosado-García A. (2003) Mechanism of granulosa cell death during follicular atresia depends on follicular size. *Theriogenology* 60:1071-1081.

Allen CA, Green DP. (1995) Monoclonal antibodies which recognize equatorial segment epitopes presented de novo following the A23187-induced acrosome reaction of guinea pig sperm. *J Cell Sci* Feb;108 ( Pt 2):767-77.

Argetsinger L.S., Carter-Su C.(1996). Mechanism of signaling by growth hormone receptor. *Physiol Rev*. Oct;76(4):1089-107. Review

Arnoult CRA, Cardullo RA, Lemos JR y Florman HM. (1996). Activation of mouse sperm t- Type Ca<sup>2+</sup> channels by protein by adhesion to the egg zona pelúcida. *PNAS* 93: 13004-10

Ashraf M, Suleiman J, Ahmad M. (1994) Ca<sup>2+</sup> preconditioning elicits a unique protection against the Ca<sup>2+</sup> paradox injury in rat heart. Role of adenosine. *Fixed. Circ Res*. 1994 Feb;74(2):360-7.

Aveldaño MI., Rotsetein NP., Vermouth NT. (1992) Lipid remodelling during epididymal maturation of rat spermatozoa. Enrichment in plasmenycholines containing long-chain polyenoic fatty acid of the n-9 series. *J Biochem* 283:235-241.

Backer MJ and Dawidowicz AE. (1987). Reconstitution of a phospholipid flippase from rat liver microsomes. *Nature* 327: 341-343.

Bailey JL. Storey BT. (1994). Calcium influx into mouse spermatozoa activated by solubilized mouse zona pellucida, monitored with the calcium fluorescent indicator, fluo-3. Inhibition of the influx by three inhibitors of the zona pellucida induced acrosome reaction: tyrphostin A48, pertussis toxin, and 3-quinuclidinyl benzilate *Mol Reprod Dev*. 1994 Nov;39(3):297-308

Baldi E, Luconi M, Bonacorsi L, Francavilla S, Gabriele A, Properzi G, Forti G. (1999). Nongenomic progesterone receptor on human spermatozoa: biochemical aspects and clinical implications. *Steroids*. Jan-Feb;64(1-2):143-8. Review.

Baldi E., Casano R., Falsetti C., Krausz C., Maggi M., Forti G. (1991) Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa. *J. Androl*. **12**: 323-330.

Baldi E., Cs. Krausz, & G. Forti (1995). Nongenomic actions of progesterone on human spermatozoa. *Trends Endocrinol Metab* 6, 198-205

Bastiaan H, Franken D, Wranz P. (1999). G-protein regulation of the solubilized human zona pellucida-mediated acrosome reaction and zona pellucida binding. *J Assist Reprod Genet*. Jul;16(6):332-6.

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

Bedford JM (1998): Mammalian fertilization misread? Sperm penetration of the eutherian zone pellucida is unlikely to be a lytic event. *Biol Reprod* 59:1275–1287.

- Bedford JM, Calvin HI, and Cooper GW. (1973). The maturation of spermatozoa in the human epididymis. *J Reprod Fertil (suppl)*;18:199-213.
- Belsey MA., Moghissi KS., Aliason RJ., Paulsen CA., Gallegos A y Prasad MRN (1980). Laboratory manual for the examination of human semen, cervical mucus interaction published by Press Concerni Singapore.
- Benoff S. (1998) Voltage dependent calcium channels in mammalian spermatozoa. *Front Biosci*. 1998 Dec 1;3:D1220-40. Review.
- Blackmore PF, Neulen J, Lattazio F. And Beebe SJ (1991). Cell surface-binding sites for progesterone mediate calcium uptake in human sperm *J Biol Chem*, 28, 18655-18659.
- Bleil JD, y Wassarman PM. (1980). Structure and function of the zona pellucida: Identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Dev. Biol.* 76:185-202.
- Bleil JD, y Wassarman PM. (1983). Sperm-egg interaction in the mouse: Sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Dev. Biol.* 95: 317-324.
- Boatman DE., Robbins RS. (1991) Bicarbonate, carbon-dioxide regulation of sperm capitation, hypermotility, and acrosome reactions. *Biol Reprod* 44: 806-813.
- Bonaccorsi LM., Luconi G., Forti G., Balde E. (1995) Tyrosine kinase inhibition reduces the plateau phase of the calcium increase in response, to progesterone in human sper. *FEBS Lett* 364: 83-86
- Bonacorsi L, Krausz C, Pecchioli P, Forti G, Baldi E. (1998). Progesterone-stimulated intracellular calcium increase in human spermatozoa is protein kinase C-independent. *Mol Hum Reprod*. Mar;4(3):259-68.
- Brandelli A. (1997). Modulation of sperm acrosomal exocytosis by guanyl nucleotides and G-protein-modifier agents. *Biochem Mol Biol Int*. May;41(6):1217-25.
- Breitbart H, Spungin B (1997): The biochemistry of the acrosome reaction. *Mol Hum Reprod* 3:195-202.
- Breitbart H., Lax J., Rotem R. & Z. Naor (1992). Role of protein kinase C in the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Biochem J* 281, 473-476
- Brewis IA, Clayton R, Barratt CL, Hornby DP, Moore HD. (1996). Recombinant human zona pellucida glycoprotein 3 induces calcium influx and acrosome reaction. *Dev Biol.* 222: 99-109.
- Brewis IA, Clayton R, Browes CE, Martin M, Barratt CL, Hornby DP. (1998). Tyrosine phosphorylation of a 95 kDa protein and induction of the acrosome reaction in human spermatozoa by recombinant human zona pellucida glycoprotein 3. *Mol Hum Reprod*. Dec;4(12):1136-44.
- Brewis IA, Wong CH. (1999). Gamete recognition: sperm proteins that interact with the egg zona pellucida. *Rev Reprod*. Sep;4(3):135-42. Review.
- Brouwers JFHM, Gadella BM, Van Golden LMG., Andielen AGM. (1998) Quantitative analysis of phosphatidylcolinamolecular species using HPLC and light scattering detection. *J Lipid Res* 39: 344-359. 7-11.
- Brucker C, Lipford GB. (1995). The human sperm acrosome reaction: physiological and regulatory mechanisms, an update. In: Edwards RG (ed.), *Human Reproduction Update*. Oxford: Academic Press. 1:51-62.
- Case GD., Vanderkooi JM., Scarpa A. (1974) Physical properties of biological membranes determined by the fluorescence of the calcium ionophore A23187. *Arch Biochem Biophys* 162:174-180.

- Cooper GW, Bedford JM. (1971). Acquisition of surface change by the plasma membrane of mammalian spermatozoa during epididymal maturation. *Anat Rec*; 169: 300-301
- Córdoba MTA, Santa-Coloma NB, Beorlegui NB, and Beconi MT. (1997). Intracellular calcium variation in heparin- capacitate bovine sperm. *Biochem Mol Biol. Int.* 41: 725-733.
- Cheng FP, Fazeli AR, Voorhout W, Bevers MM, Colenbrander B. (1996). Use of PNA (peanut agglutinin) to assess acrosomal status and the zona pellucida induced acrosome reaction in stallion spermatozoa. *J Androl*; 17:674–682. 6.
- Cheng FP, Fazeli AR, Voorhout WF, Tremoleda JL, Bevers MM, Colenbrander B. (1998). Progesterone in mare follicular fluid induces the acrosome reaction in stallion spermatozoa and enhances *in vitro* binding to the zona pellucida. *Int J Androl*; 21:57–66.
- Dawson RMC, Scott TW. (1964). Phospholipid composition of epididymal spermatozoa prepared by density gradient centrifugation. *Nature* 202:292-293.
- de Lamirande E., Leclerc P., Gagnon C. (1997). Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Mol. Hum. Reprod* 3:175–194.
- de Vries KJ., Wiedmer T., Sims PJ., Gadella BM. (2003) Caspase-independent exposure of aminophospholipids and tyrosine phosphorylation in bicarbonate responsive human sperm cells. *Biol Reprod* 68:2122–2134.
- Deleke, DL and Huestis WH. (1985). *Biochemistry* 24: 5406-5416
- Devaux PF, Zachowski, A., Morrot, G., Cribier, S., Fellman, P., Geldwerth, D., Bitbol, M. Y Herve, P. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1990, 12:517-522
- Dunina-Barkovskaya A. (1998). pH dependence of junctional conductance. *Membr Cell Biol.*11(6):793-801.
- Edwards RG, Ferguson LC, Cooms RRA. (1964). Blood group antigens on human spermatozoa. *J Reprod Fertil*; 7:153-61.
- Emiliozzi C and Fenichel P. (1997). Protein tyrosine phosphorylation is associated with capacitation of human sperm *in vitro* but is not sufficient for its completion. *Biol. Reprod.* 56: 674-679.
- Espinosa AF, Darszon A, (1998). Mouse sperm membrane potential changes induced by Ca<sup>2+</sup>. *Febbs lettres* 372: 119-125.
- Evans RW, Weaver DE; Clegg ED. (1980). Diacyl, alkenyl and alkylether phospholipids in ejaculated, in utero-, and *in vitro* incubated porcine spermatozoa. *J Lipid Res*; 21:223-228.
- Farge E. Deveraux PF. (1992) Shape changes of giant liposomes induced by an asymmetric transmembrane distribution of phospholipids. *Biophys. J* 61:347-357.
- Fazeli A. R., Zhang B. R., Steenweg W., Larsson B., Beyers M. M., Van Den Broek J., Rodríguez-Martínez H., Colenbrander B. (1997). Relationship between sperm-zona pellucida binding assays and the 56-day nonreturn rate of cattle inseminated with frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 48, 853-863.
- Fraser LR and McDermott CA. (1992) Ca (2+) related changes in the mouse sperm capacitation state a possible role for Ca (2+) ATPase. *J Reprod Fertol*, 96, 363-377.
- Fraser LR. (1998). Sperm capacitation and the acrosome reaction. *Hum Reprod. Apr*;13 Suppl 1:9-19. Review.
- Frits M. Flesch FM., Barend M. Gadella. (2000) Dynamics of the mammalian sperm plasma membrana in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta* 1469, 197-235.

- Frits M. Flesch FM., Brouwers JF., Nievelstein PFEM., Verkleij AJ., van Golde LM., Colenbrander B., Barend M. Gadella BM. (2001) Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane *J Cell Sci.* 114: 3543-3555.
- Furuya S., Y. Endo, M. Oba & S. Suzuki (1993): Effects of modulators of protein kinase C on human sperm capacitation. *Fertil Steril* 59, 1285-1290.
- Gadella BM, et al (1999). Scrambling of phospholipid asymmetry in the apical plasma membrane of acrosome-intact boar sperm cells during *in vitro* capacitation. *Biol Reprod* 60 (Suppl 1), 207.
- Gadella BM, Harrison RAP (2002). Capacitation induces cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. *Biol Reprod* 67:340-350.
- Gafo C., Garde JJ. (1994) Métodos de valoración de la capacitación y reacción acrosómica en mamíferos. *Med Vet.*, 11: 201-210.
- García-Macedo R, et al (2001): Effect of bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar (B-Type) proton ATPases, on the capacitation of rabbit spermatozoa. *Andrologia* 33:113-121.
- Garty NB, Galiani D, Aharonheim A, Ho YK, Phillips, Dekel N, Salomon Y. (1988). G-proteins in mammalian gametes: an immunocytochemical study. *J Cell Sci.* 1988 Sep;91 ( Pt 1):21-31.
- Garty NB. And Solomon Y. ( 1987). Stimulation of partially purified adenylyl cyclase from bull sperm by bicarbonate. *FEBS Letter.* 218: 148-152.
- Gong XH, Dubois DH, Miller DJ, Shur BD. (1995). Activation of a G protein complex by aggregation of B-1,4 galactosyltransferase on the surface of sperm. *Sci.* 269: 1718-1721.
- Gouldson PR, Snell CR, Bywater RP, Higgs C, Reynolds CA. (1998). Domain swapping in G-protein coupled receptor dimers. *Protein Eng.* Dec;11(12):1181-93.
- Green CM, et al (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.
- Harkeman W, Harrison RAP, Miller NGA, Topper EK y Woelders H. (1998). Enhanced binding of zona pellucida proteins to the acrosomal region of intact boar spermatozoa in response to fertilizing conditions: a flow cytometric study. *Biol reprod.* 58:421-430.
- Harrison RA., Mairet B, and Miller NGA. (1993). Flow cytometric studies of bicarbonate-mediated  $Ca^{2+}$  influx in boar sperm populations. *Mol. Reprod. Dev.* 35: 197-208.
- Harrison RAP. (1996) Capacitation mechanisms and role of capacitation as seen in eutherian mammals. *Reprod Fertil Dev* 8, 581-594.
- Hekman A, Rumke P. (1969). The antigens of human seminal plasma with special reference to lactoferrin, a spermatozoa coating antigen. *Fertil Steril*;20:312-323.
- Hermann A., Zachowski A., Devaux PF., Blumenthal R. (1991) In *Cell and Model Membrane Interactions* (Ohki, S., Ed.) pp 89-113, Plenum Press, New York.
- Hinkovska V, Dimitrov GP, Koumanov KD. (1986). Phospholipid composition and phospholipid asymmetry of ram spermatozoa plasma membranes. *Int. J Biochem* 18:1115-1121.
- Homan RY., Pownall HJ. (1988) *Biochim. Biophys. Acta.*, 938:155-166.



- Hunnicutt GR., Primakoff P., Mytes DG. (1996) Sperm surface protein PH-20 I bifunctional: one activity is a hyaluronidase and second, distinct activity is required in secondary sperm-zona binding. *Biol Reprod* 55: 80-86.
- Jensen LJ, Schmitt BM, Berger UV, Nsunum NN, Boron WF, Hediger MA (1999). Localization of sodium bicarbonate cotransporter (NBC) protein and messenger ribonucleic acid in rat epididymis. *Biol Reprod. Mar*;60(3):573-9.
- Kaul G, Sing S, Gandhi KK, anand SR. (1997). Calcium requirement and time course of capacitation of goat spermatozoa assessed by chlortetracycline assay. *Andrologia*. 1997 Sep-Oct;29(5):243-51.
- Kerek G, Biberfeld P, Afzelius BA. (1973). Demonstration of HL- A antigens, "species," and "semen" – specific antigens on human spermatozoa. *Int J Fertil*;18:145-155.
- Kirkman-Brown JC, et al (2002): Zona pellucida and progesterone-induced Ca<sup>2+</sup> signaling and acrosome reaction in human spermatozoa. *J Androl* 23: 306-315.
- Koopman G, et al (1994): Annexin-V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84:1415-1420.
- Koyama Y, Takuda Y, Takamura T, Isojima S. (1983). Localization of human seminal plasma No. 7 antigen (ferrisplan) in accessory glands of the male genital tract. *J Reprod Immunol*;5:135-143.
- Kumar R, Thompson EB. (1999). The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids*. May;64(5):310-9. Review
- Kuypers A.; Lewis A.; Hua M. (1996). Determination of altered membrane phospholipid asymmetry in subpopulations of human red blood cells using fluorescently labeled annexin V. *Blood* 87,3, 1179-1187.
- Lalumiere G, Bleau G, Chapdelaine A, Roberts KD. (1976). Cholesterol sulfate and sterol sulphatase in the human reproductive tract. *Steroids*;27:247-260.
- Langlais, J. Y Roberts KD. (1985). A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete. Res.*, 12:188-224.
- Leclerc P, Kopf GS. (1999). Evidence for the role of heterotrimeric guanine nucleotide-binding regulatory proteins in the regulation of the mouse sperm adenylyl cyclase by the egg's zona pellucida. *J Androl*. 1999 Jan-Feb;20(1):126-34.
- Leclerc, P., de Lamirande, E. and Gagnon, C. (1996). Cyclic adenosine 3',5'monophosphate-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility. *Biol. Reprod.* 55, 684-692.
- Leyton L, LeGuen P, Bunch D and Saling PM (1992). Regulation of mouse gamet interaction by a sperm tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89,11692-11695.
- Leyton L. y Saling PM. (1989). 95kd sperm proteins bind zp3 and serve as tyrosine kinase substrates in response to zona binding. *Cell.*, 57:1123-1130.
- Libersky EA, Boatman DE. (1995). Progesterone concentrations in serum, follicular fluid, and oviductal fluid of the golden hamster during the periovulatory period. *Biol Reprod. Sep*;53(3):477-82.
- Lin Y, Kan FW (1996): Regionalization and redistribution of membrane phospholipids and cholesterol in mouse spermatozoa during *in vitro* capacitation. *Biol Reprod* 55:1133–1146.
- Lin, D.S., Connor, W.E., Wolf, D.P., Neuringer, M., and Hachey, D.L. (1993). Unique lipids of primate spermatozoa: desmosterol and docosahexaenoic acid. *J. Lipid Res.* 34:491–499.

- Linares-Hernández L, Guzmán-Grenfell AM, Hicks-Gomez JJ. (1998). Voltage-dependent calcium influx in human sperm assessed by simultaneous optical detection of intracellular calcium and membrane potential. *Biochim Biophys Acta*. Jun 24;1372(1):1-12.
- Lu, Q, and Shur BD. (1997). Sperm from beta 1.,4 -galactosyltransferase null mice are refractory to ZP3 induced acrosomes reaction and penetrate the zona pellucida poorly and penetrate the zona pellucida poorly. *Development* 124: 4121-4131.
- Llanos MN (1994). Evidence in support of a role for Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channels in the hamster sperm acrosome reaction. *J Exp Zool*. 1994 Aug 1;269(5):484-8.
- Llanos MN, Morales P y Riffo MS. (1993). Studies of lysophospholipids related in the hamster sperm acrosome reaction *in vitro*. *J Exp. Zool*. 267:209-216.
- Majewska MD, Harrison NL, Schwartz RD, Barker JL, Paul SM. (1986). Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science*. May 23;232(4753):1004-7.
- Mann, T. and Litwak-Mann, C. (eds) (1981) *Male Reproductive Function and Semen*. Springer-Verlag, Berlin, 495 pp.
- Martinez-Menarguez JA, Geuze HJ, Ballesta J. (1996). Evidence for a nonlysosomal origin of the acrosome. *J Histochem Cytochem*. 1996 Apr;44(4):313-20.
- McLeskey SB, Dowds C, Carballada R, White RR, Saling PM. (1998). Molecules involved in mammalian sperm-egg interaction. *Int Rev Cytol*. 177:57-113. Review.
- Meizel S, Turner KO (1996). Chloride efflux during the progesterone-initiated human sperm acrosome reaction is inhibited by lavendustin A, a tyrosine kinase inhibitor. *J Androl*. Jul-Aug;17(4):327-30.
- Melendrez CS, Meizel S, Berger T. (1994). Comparison of the ability of progesterone and heat solubilized porcine zona pellucida to initiate the porcine sperm acrosome reaction *in vitro*. *Mol Reprod Dev* 39: 433-438.
- Melendrez CS, Meizel S. (1995). Studies of porcine and human sperm suggesting a role for a sperm glycine receptor/Cl<sup>-</sup> channel in the zona pellucida-initiated acrosome reaction. *Biol Reprod* 53:676-683.
- Merlet F, Weinstein LS, Goldsmith PK, Rarick T, Hall JL, Bisson JP, deMazancourt P. (1999). Identification and localization of G protein subunits in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod*. 1999 Jan;5(1):38-45.
- Meyer C, Schmieding K, Falkenstein E, Wehling M. (1998). Are high-affinity progesterone binding site(s) from porcine liver microsomes members of the sigma receptor family? *Eur J Pharmacol*. 1998 Apr 24;347(2-3):293-9.
- Miller DJ, et al (1993): Sperm require  $\beta$ -N-acetyl-glucosaminidase to penetrate through the egg zona pellucida. *Development* 118:1279-1289.
- 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.
- Müller P, Pomorski, T., Porwoli, S. Tauber R. y Herrmann, A. (1996). Transverse movement of spin-labeled phospholipids in the plasma membrane of a hepatocytic cell line (HepG2): implications for biliary secretion. *Hepatology* 24, 1497-1503.
- Nakano M, Yonezawa N, Hatanaka Y, Noguchi S. (1996). Structure and function of the N-linked carbohydrate chains of pig zona pellucida glycoproteins. *J Reprod Fertil Suppl*. 50:25-34. Review.

- Nassar A, Mahony M, Morshedi M, Lin MH, Srisombut C, Oehninger S. (1999). Modulation of sperm tail protein tyrosine phosphorylation by pentoxifylline and its correlation with hyperactivated motility. *Fertil Steril.* 1999 May;71(5):919-23.
- Naz R. K., K. Ahmad & R. Kumar: (1991). Role of membrane phosphotyrosine proteins in human spermatozoa function. *J Cell Sci* 99, 157-165
- Nolan, J. P and Hammerstedt RH (1997). Regulation of membrane stability and acrosome reaction in mammalian sperm. *FASEB J* 11: 670-682.
- Nolan, J. P., Magargee, S. F., Posner, R. G. y Hammerstedt, R (1995). Flow cytometric analysis of transmembrane phospholipid movement in bull sperm. *Biochemistry* 33, 9968-9974
- Oehninger S, Patankar M, S epala M, Clark GF. (1998). Involvement of selectin-like carbohydrate binding specificity in human gamete interaction. *Andrologia.* Aug-Sep;30(4-5):269-74.
- Okamura N and Sugita Y. (1983). Activation of spermatozoa an adenylate cyclase by a low molecular weight factor in porcine seminal plasma. *J Biol Chem.* 258(21):13056-62.
- Okamura N, Tajima Y, Soejima A, Masuda H. And Sugita Y. (1985). Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem* 260: 9699-9705.
- Oliphant G, Singhas CA. (1979). Lodination of rabbit sperm plasma membrane: relationship of specific surface proteins to epididymal function and sperm capacitation. *Biol Reprod*;21:937-944.
- Op den Kamp, JA. (1979). Lipid asymmetry in membranes *Annu. Rev. Biochem.* 48:47-71.
- Osheroff JE. Visconti PE., Valenzuela JP, Travis JA., Alvarez J and Kopf SG. (1999). Regulation of human sperm capacitation by a cholesterol efflux-stimulated signal transduction pathway leading to protein kinase A-mediated up-regulation of protein tyrosine phosphorylation. *Mol Hum Reprod.* (11):1017-26.
- Osman RA, Andria ML, Jones AD and Meizel S (1989). Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun*, 160, 828-833.
- Ozgur K, Patankar MS, Oehninger S, Clark GF (1998). Direct evidence for the involvement of carbohydrate sequences in human sperm-zona pellucida binding. *Mol Hum Reprod.* (4):318-24.
- Parkkila S, Kaunisto K, Kellokumpu S, Rajaniemi H. (1991). A high activity carbonic anhydrase isoenzyme (CA II) is present in mammalian spermatozoa. *Histochemistry.*;95(5):477-82.
- Parks JE and Hammerstedt RH. (1985). Developmental changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. *Biol. Reprod.* 32: 653-668.
- Prasad SV, Wikins B, Dumbar BS. (1996). Molecular biology approaches to evaluate species variation in immunogenicity and antigenicity of zona pellucida proteins. *J Reprod Fertil Suppl.*;50:143-9.
- Pukazhenthil BS, Long JA, Wildt DE, Ottinger MA, Armstrong DL, Howard J. (1998). Regulation of sperm function by protein tyrosine phosphorylation in diverse wild felid species. *J Androl.* 1998 Nov-Dec;19(6):675-85.
- Rana ABS, Misra S, Majumder GC, Ghosh A. (1993). Phospholipid asymmetry of goat sperm plasma membrane during epididymal maturation. *Biochem Biophys Acta* 1210: 1-7.
- Reyes A.; Goicoechea B. Y Rosado A (1978). Calcium requirement for rabbit spermatozoal capacitation and enhancement of fertilizing ability by ionophore a23187 and cyclic adenosine 3':5'-monophosphate. *Fertility and Sterility.*, 29:451-455.

- Roldan ER, et al (1994): Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida. *Science* 266: 1578-1581.
- Rufo GA Jr, Schoff PK, Lardy HA. (1984). Regulation of calcium content in bovine spermatozoa. *J Biol Chem.* 1984 Feb 25;259(4):2547-52.
- Rufo GA, Jr, Singh JP, Babcock, DF y Lardy HA. (1982). Purification and characterization of a calcium transport inhibitor protein from bovine seminal plasma. *J Biol Chem.* 1982 Apr 25;257(8):4627-32.
- Ruknudin A, Silver IA. (1990). Ca<sup>2+</sup> uptake during capacitation of mouse spermatozoa and the effect of an anion transport inhibitor on Ca<sup>2+</sup> uptake. *Mol Reprod Dev.* May;26(1):63-8.
- Sabeur K, Edwards DP, Meizel S. (1996). Human sperm plasma membrane progesterone receptor(s) and the acrosome reaction. *Biol Reprod*; 54:993-1001.
- Sabeur K., Cherr GN, Yudin AI, Primakoff P, Li MW and Overstreet JW. (1997). The PH-20 protein in human spermatozoa. *J. Androl.* 18: 151-158.
- Saling, P.M. and Storey, B.T. (1979). Mouse Gamete interactions during fertilization *in vitro*: chlorotetracycline as a fluorescent probe for the mouse sperm acrosome reaction. *J. Cell Biol.*, 83, 544-555.
- Scott TW, Voglmayr JK, Stechell BP. (1967). Lipid Composition and metabolism in testicular and ejaculated ram spermatozoa. *Biochem J* 102:456-461.
- Schneider, E., Haest, CWM., Plasa, G. y Deuticke, B. 1986 *Biochim. Biophys. Acta.*, 855:325-336.
- Schroit AJ, Zwaal RFA. (1991) Transbilayer movement of phospholipids in red cell and platelet membranes. *Biochim Biophys Acta.* 1071:313
- Seigneuret, M. Y PF. Devaux. (1984) ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane. Relation to shape change. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 71:3751-3755.
- SengoKu K, Tamate K, Takuma N, Takaoka Y, Yoshida T, Nishiwaki K. (1996). Involvement of protein kinases in platelet activating factor-induced acrosome reaction of human spermatozoa. *Mol Hum Reprod.* Jun;2(6):401-4.
- Shur, BD. (1999). Cell surface galactosyltransferase. In *Guidebook to the Extracellular Matrix and Adhesion Proteins*, T. Kreis and R. Vale eds. (Oxford: Oxford University Press), in press.
- Sirivaidyapong S, Bevers MM, Colenbrander B. (1999). Acrosome reaction in dog sperm is induced by a membrane-localized progesterone receptor. *J Androl.* Jul-Aug;20(4):537-44.
- Smith TT. (1998). The modulation of sperm function by the oviductal epithelium. *Biol Reprod.* 1998 May;58(5):1102-4. Review. No abstract available.
- Snell, WJ. And White, JM. (1996). The molecules of mammalian fertilization. *Cell* 85, 629-637.
- Suarez SS, Meizel S, y Wolf DP. (1986). Induction of the acrosome reaction in human spermatozoa by a fraction of human follicular fluid. *Gamete Res.*, 14:107-122.
- Suarez SS. (1987) Sperm transport and motility in the mouse oviduct: observation in situ. *Biology Reprod.* 36, 203-210.
- Suarez SS. y Dai X., (1995). *Mol. Reprod. Dev.* 42, 325
- Sulpice JC., Alain Z., Philippe FD y Françoise G. (1994). Requirement for phosphatidylinositol 4,5-Biphosphate in the Ca<sup>2+</sup> induced phospholipid redistribution in human erythrocyte membrane. *The Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 269,6347-6354

- Swanson EW, Berden HJ. (1951). An eosin nigrosin stain for differentiating live and dead bovine spermatozoa. *J. animal Sci.* 10: 981-87
- Thérien I, Manjunath P (2003): Effect of Progesterone on Bovine Sperm Capacitation and Acrosome Reaction. *Biology of Reproduction* 69:1408–1415.
- Tomes CN, MCMaster CR, Saling PM. (1996). Activation of mouse sperm phosphatidylinositol-4,5 bisphosphate-phospholipase C by zona pellucida is modulated by tyrosine phosphorylation. *Mol Reprod Dev.* Feb;43(2):196-204.
- Topfer-Petersen E, Romero A, Varela PF, Ekhlesi-Hundrieser M, Dostalova Z, Sanz L, Calvete JJ. (1998). Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia.* Aug-Sep;30(4-5):217-24. Review.
- Toshimori K. (1982). Penetration of the mouse sperm head through the zona pellucida *in vivo*: an electronmicroscope study at 200KV. *Biol Reprod.* Apr;26(3):475-81.
- Travis AJ, Kopf GS (2002). The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. *J Clin Invest* 110:731–736.
- Vermes I., Clemens H., Helga S., Chris R., (1995). A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of immunological Methods.*, 184:39-51.
- Vierla M, Rajaniemi H, (1980). Radioiodination of surface proteins of bull spermatozoa and their characterization by sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis. *J Reprod Fertil.* Mar;58(2):483-9.
- Visconti, PE and Kopf GS.(1998). Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol. Reprod.* 59: 1-6.
- Visconti, PE., Bailey, JL., Moore, GD., Pan, D., Olds-Clarke, P. And Kopf, GS. (1995). Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* 121, 1129-1137.
- Walensky LD, Snyder SH. (1995). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm. *J Cell Biol.* 130: 857-869.
- Wassarman PM. (1992). Mouse gamete adhesion molecules. *Biol Reprod.* 1992 Feb;46(2):186-91. Review.
- Wess J., (1997). G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. *FASEB J.* Apr;11(5):346-54. Review.
- Westwbnbroek RE, Babcock DF. (1999). Discrete regional distributions suggest diverse functional roles of calcium channel alpha1 subunits in sperm. *Dev Biol.* Mar 15;207(2):457-69.
- Wilde MW, Ward CR, Kopf GS. (1992). Activation of a G protein in mouse sperm by the zona pellucida, an egg-associated extracellular matrix. *Mol Reprod Dev.* Apr;31(4):297-306.
- Williamson, P.; Kulick, A.; Zachowski, A.; Schlegel, RA and Devaux, PF. *Biochemistry.* (1992). Ca<sup>++</sup> induces transbilayer distribution of all major phospholipids in human erythrocytes. *Biochemistry* 31: 6355-6360.
- Williamson, P.;Algarin L.;Bateman J.; Choe HR. Y Schlegel, RA. (1985). Phospholipid asymmetry in human erythrocyte ghosts. *J. Cell Physiol.* 123: 209-214.
- Yanagimachi R. Noda YD, Fujimoto M, Nicolson G. (1972). The distribution of negative surface changes on mammalian spermatozoa. *Am J. Anat;* 135: 497-520.

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

Yurewicz EC, Sacco AG, Gupta SK, Xu N, Gage DA. (1998). Hetero-oligomerization-dependent binding of pig oocyte zona pellucida glycoproteins ZPB and ZPC to boar sperm membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 273:7488-7294

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





Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00004

PERDIDA DE LA ASIMETRIA FOSFOLIPIDICA DE LA MEMBRANA PLASMATICA DEL ESPERMATOZOIDE DE CONEJO DURANTE LA CAPACITACION Y LA REACCION ACROSOMAL.

En México, D.F., se presentaron a las 12:00 horas del día 26 del mes de julio del año 2004 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. ADOLFO ROSADO GARCIA
- DRA. ALDA ROCIO ORTIZ MUÑIZ
- DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA
- DR. ALBERTO MARTIN GUZMAN GRENFELL
- DRA. ANA MARIA ROSALES TORRES

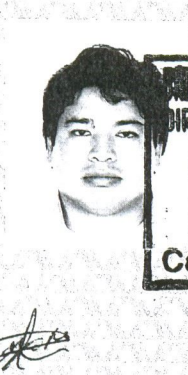
Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DE: ALEJANDRO AVALOS RODRIGUEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

*Aprobar*

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



*[Handwritten signature]*

ALEJANDRO AVALOS RODRIGUEZ  
FIRMA DEL ALUMNO

REVISÓ

*[Handwritten signature]*

LIC. CARMEN LORENS FABREGAT  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISION DE CBS

*[Handwritten signature]*

DR. OSCAR ARMANDO MONROY  
HERMOSILLO

PRESIDENTE

*[Handwritten signature]*

DR. ADOLFO ROSADO GARCIA

VOCAL

*[Handwritten signature]*

DRA. ALDA ROCIO ORTIZ MUÑIZ

VOCAL

*[Handwritten signature]*

DRA. REYNA CARMEN FIERRO  
PASTRANA

VOCAL

*[Handwritten signature]*

DR. ALBERTO MARTIN GUZMAN  
GRENFELL

SECRETARIA

*[Handwritten signature]*

DRA. ANA MARIA ROSALES TORRES