

T
509

90867



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 BR. ALEJANDRO ÁVALOS RODRÍGUEZ

COMITÉ TUTORIAL

COTUTOR: DR. ADOLFO ROSADO GARCÍA

COTUTORA: DRA. ANA MARÍA ROSALES TORRES

ASESORA: DRA. ALDA ROCÍO ORTIZ MUÑIZ

ASESORA: DRA. REYNA FIERRO PASTRANA

MÉXICO, D.F.



2004

LO MAS DIFÍCIL DEL COMIENZO DE TODO ES DAR EL PRIMER PASO, PARA EL DÍA 26 DE JULIO DEL 2004 POR LA TARDE INTENTARE DARLO, SI LO LOGRO SIÉNTANSE ORGULLOSOS, POR QUE TODO ESTO FUE GRACIAS A USTEDES, Y SI RESBALO, NO SE PREOCUPEN ME LEVANTARE CON MÁS FUERZA.

AGRADECIMIENTOS

A MI MEJOR AMIGA: MI ESPOSA, CLARA ORTEGA CAMARILLO

POR SER UNA DE LAS PERSONAS MAS VALIOSAS QUE SIEMPRE ME HA ACOMPAÑADO, APOYADO Y QUE SIGUE PREOCUPÁNDOSE POR MI SUPERACIÓN Y FORMACIÓN PROFESIONAL.

A MIS HIJOS: DANIEL ALEJANDRO (CHUCHI) Y PAULINA XIMENA (PEQUEÑITA)

POR QUE GRACIAS A ELLOS, HE SENTIDO LO QUE ES LA VIDA, ADEMÁS DE SER LO MEJOR QUE HE HECHO, CLARO CON AYUDA.

A MIS RATONES: SR. FIDEL ÁVALOS LEYVA Y ADELA RODRÍGUEZ AVILA

A MIS HERMANOS: HÉCTOR, MARÍA DE LOS ANGELES, MARÍA DE LA LUZ, JOSÉ ANTONIO, MIGUEL ANGEL Y GERARDO

COMO UN TESTIMONIO DE GRATITUD Y ETERNO RECONOCIMIENTO, POR TODO EL APOYO INCONDICIONAL QUE ME HAN BRINDADO Y POR QUE GRACIAS A EL, HE LOGRADO DAR EL PRIMER PASO.

A MIS SOBRINOS: ALEJANDRA, FERNANDA, MIRIAM, MICHEL, MARIANA, EMILIO, LUIS, ULISES Y RODRIGO

A MIS CUÑADAS Y CUÑADOS: MARTHA, MIGUEL, BENIGNO, ARACELI Y SALOME

DRA. ANA MARIA ROSALES TORRES

POR QUE LA MAYOR PARTE DE MI FORMACIÓN SE LA DEBO A ELLA; POR SER UN EJEMPLO A SEGUIR, Y POR LA ACERTADA DIRECCIÓN DE ESTA TESIS.

PERO SOBRE TODO, POR SU AMISTAD, ENTUSIASMO Y DEDICACIÓN.

GRACÍAS

DR. ADOLFO ROSADO GARCÍA

UN SABIO EXTRAORDINARIO QUE HA VERTIDO PARTE DE SU AMPLIO CONOCIMIENTO EN ESTE TRABAJO Y QUE FUÉ CLAVE PARA SU CULMINACIÓN.

GRACÍAS POR TODO.

DRA. REBECA GARCÍA MACEDO

QUIEN ME ENSEÑO VARIAS DE LAS ESTRATEGIAS QUE UTILIZE EN ESTE TRABAJO

DR. ALBERTO MARTÍN GUZMÁN GRENFELL
POR SU ASESORAMIENTO Y AMISTAD

DRA. IVONNE HEUZE

POR LA DONACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO CON EL QUE SE TRABAJO

DRA. ALDA ROCIO ORTIZ MUÑIZ

POR SU ASESORAMIENTO Y POR PERMITIRME TRABAJAR EN SU LABORATORIO.

DRA. REYNA FIERRO PASTRANA

POR SU ACERTADO ASESORAMIENTO.

A MIS AMIGAS: ADRIANA, MIREYA, MARY, JANETH, ALICIA, AZUCENA, GISELA Y JACQUELINE

POR HACER DE MI VIDA ALGO INOLVIDABLE.

A MIS AMIGOS: HÉCTOR, GERARDO. ANGEL, CELSO, JESÚS, ADRIAN

POR LOS MOMENTOS DIVERTIDOS QUE HEMOS PASADO.

A LAS PERSONAS MÁS BONDADOSAS E INTELIGENTES QUE CONOZCO Y QUE CON ORGULLO LO DIGO, QUE SON PARTE DE MI FAMILIA: MARCELA VERGARA ONOFRE Y JOSÉ MANUEL GONZALEZ BUSTAMANTE.

POR QUE SIEMPRE ME HAN APOYADO Y POR QUE SI NO LES AGRADEZCO ME LO VAN A REPROCHAR TODA LA VIDA.

GRACIAS POR TODO Y ESPERO QUE LO MAS PRONTO POSIBLE CULMINEN LO QUE ALGUN DÍA, HACE DOS DECADAS PLANEARON.

“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”

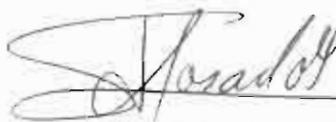
El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presento.

M en BR. Alejandro Ávalos Rodríguez

El día 26 de julio del 2004

COMITÉ TUTORAL

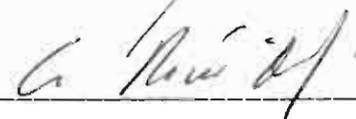
Cotutor: Dr. Adolfo Rosado García



Cotutora: Dra. Ana María Rosales Torres



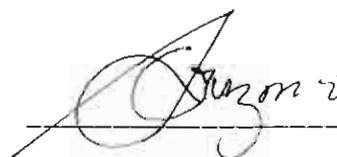
Asesora: Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz



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**

SINODAL

DR. ALBERTO MARTÍN GUZMÁN GRENFELL

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)

INDÍCE

I.- RESUMEN	1
II.- SUMMARY	2
III.- INTRODUCCIÓN	3
IV.- ANTECEDENTES	5
1.- Espermatozoide maduro	5
2.- Membrana Plasmática del Espermatozoide Eyaculado	5
2.1- Distribución heterogénea de los componentes estructurales de la membrana plasmática del espermatozoide	7
3.- Asimetría de la membrana plasmática	10
4.- Capacitación Espermática	14
4.1.- Regulación de la fosforilación	15
4.2.- Canales iónicos	17
4.3.-Glicocálix	19
4.4.- Fluidez y permeabilidad membranaral	20
4.5. Movilidad	20
5.- Reacción Acrosomal	21
5.1.- Unión espermatozoide con la zona pelúcida	23
5.2.- Agregación de receptores	27
5.3.- Cambios membranales durante la reacción acrosomal	28
5.3.1.-Fosforilación de proteínas	28
5.3.2.- Proteínas G	29
5.3.3.- Canales iónicos	30
5.4.- Inducción de la reacción acrosomal	31
V.- Planteamiento del problema	33

VI.- Hipótesis	36
VII.- Objetivo general	36
VIII.- Objetivos particulares	36
IX.- Material y métodos	37
X.- Resultados	43
XI.- Discusión	57
XII.- Conclusiones	69
XIII.- Bibliografía	70

I.- RESUMEN

Este estudio se realizó con la finalidad de evaluar la pérdida de la asimetría fosfolípida 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 fosfolípida, 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 the phosphatidylserine translocation in head plasma membrane of Percoll-gradient purified of 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 (oolema) (Frits et al., 2000) produciendo la penetración de la cabeza del espermatozoide al interior del citoplasma del gameto femenino.

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 (Lalumiére 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).

2.1- Distribución heterogénea de los componentes estructurales de la membrana plasmática del espermatozoide

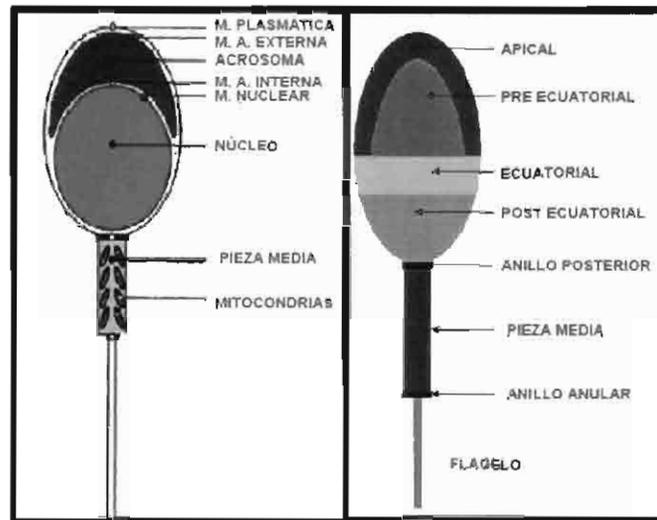
La membrana plasmática del espermatozoide se caracteriza por estar subdividida en regiones bien delimitadas a pesar de la reconocida capacidad de la membrana plasmática para la migración lateral de proteínas y lípidos. Estas regiones denominadas dominios difieren notablemente en composición y función (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 (modificado de : 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 esterol 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 esterol 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 fosfolipídicos 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).

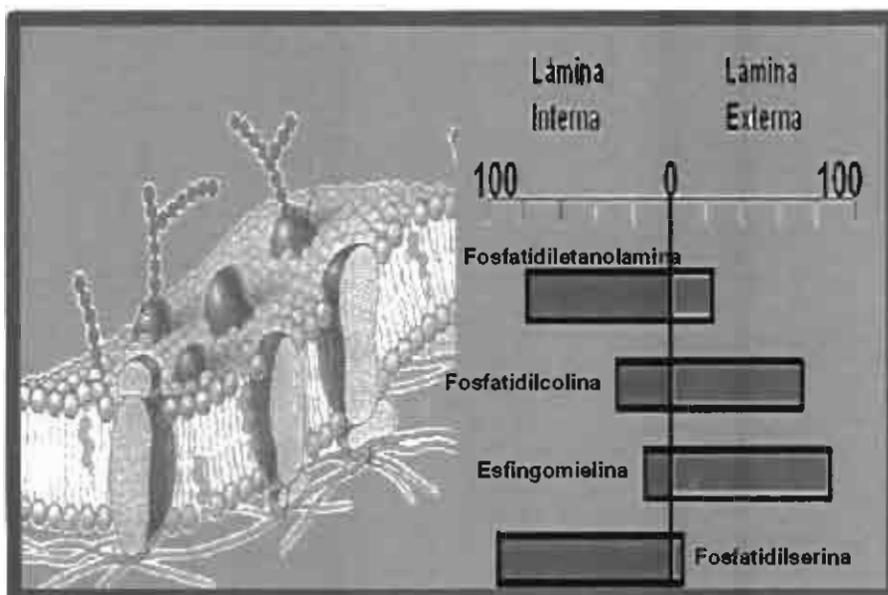
Los iones de calcio juegan un importante papel en algunos procesos fisiológicos por su habilidad para regular la estructura y función de las membranas celulares y por sus acciones en algunas vías metabólicas, particularmente aquellas involucradas en los procesos de contractibilidad y metabolismo energético.

Es conocido que el incremento de la concentración del Ca^{2+} citosólico, inducido por el ionóforo A-23187, o por incorporación de 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 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 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 (modificado de: Rana et al, 1993 y Hinkovska et al., 1986)..

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 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 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 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 μM) 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 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Rufo et al., 1984) y probablemente otros.

Además de estas se ha descrito la presencia de IP_3 dependiente de Ca^{2+} en el acrosoma (Walensky y Zinder, 1995) así como la presencia de ATPasa dependiente de Ca^{2+} en el acrosoma, esto sugiere que el acrosoma podría servir como un regulador intracelular de Ca^{2+} . No obstante el 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 Ca^{2+} . Se ha postulado que los niveles de 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 Ca^{2+} que inhibe la capacitación. La inhibición de calmodulina o calmodulina sensible a las ATPasas – Ca^{2+} produce un incremento en la concentración intracelular de 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 Ca^{2+} citoplasmático por ATPasas- 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 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 Ca^{2+} parecen estar involucrados en los incrementos de Ca^{2+} (Cordoba et al., 1997), a este respecto la despolarización del potencial de la

membrana plasmática es un prerrequisito 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 tirosincinasa 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 membranar.

La composición de los fosfolípidos y su relación con el colesterol regulan la fluidez y permeabilidad iónica de las membrana 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 membranar, 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).

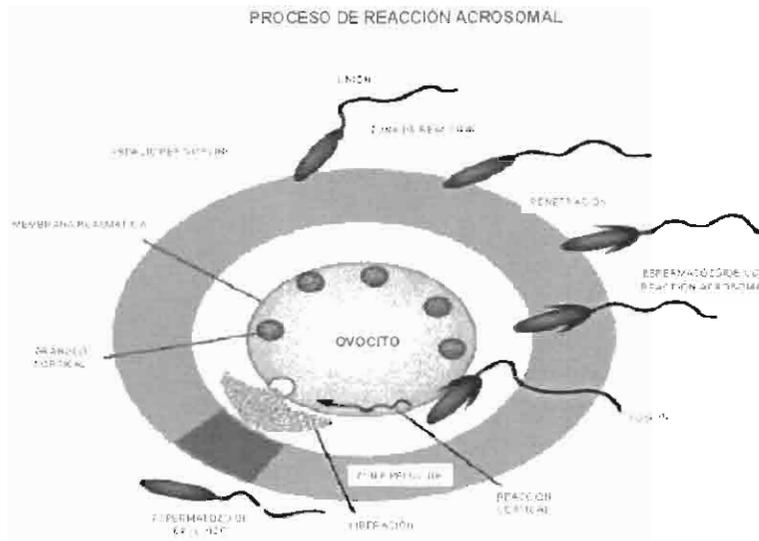
4.5. Movilidad.

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).

Esquema 3



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 (modificado de: Frits et al., 2000).

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 (Ozgun 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 raton, pero ya demostrada en varias especies de mamíferos (Leyton y Saling, 1989; Pukazhenthii 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 β 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 γ 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 γ 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 Ca²⁺ al espermatozoide. La inhibición de tirosino cinasas reduce la entrada de Ca²⁺ inducida por progesterona (Bonaccorsi et al., 1998)

Otras proteín-cinasas 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 (μM) 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 (μM y 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 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 Ca^{2+} por progesterona son inciertas. La unión de progesterona y la estimulación de un receptor para el ácido γ -aminobutírico (GABA)/canal de Cl^- ha sido estudiado en el

cerebro (Majewska et al., 1986). La idea de que la progesterona actúa vía receptor $GABA_A$ /canal 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 Cl^- (Meizel y Turner, 1996) y además porque este efecto de la progesterona fue bloqueado por antagonistas del receptor $GABA_A$ /canal Cl^- (Melendrez y Meizel, 1995; Roldan et al., 1994). La activación del receptor $GABA_A$ 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 Ca^{2+} a través de los canales de 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) 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 fosfolípida 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 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 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 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 CaCl₂, glucosa, 1 mg/ml de albúmina de suero bovino, ajustado a un pH 7.6), a una concentración final de 2.5×10^7 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% CO₂ / 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) 10 µM 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 20 µl 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 μ l (150,000 células) de la muestra y se le adicionó 1 μ l de IP (50 μ g/ml), para valorar la viabilidad de los espermatozoides, para detectar la exposición de fosfatidilserina en el espermatozoide se adicionó a cada muestra 20 μ l de Anexina-V (10 μ g/ml) en buffer de unión (10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4 140 mM NaCl, 5 mM CaCl₂). Las muestras se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad, posteriormente las muestras se analizaron en un citómetro de flujo FACSsort (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 $p < 0.05$.

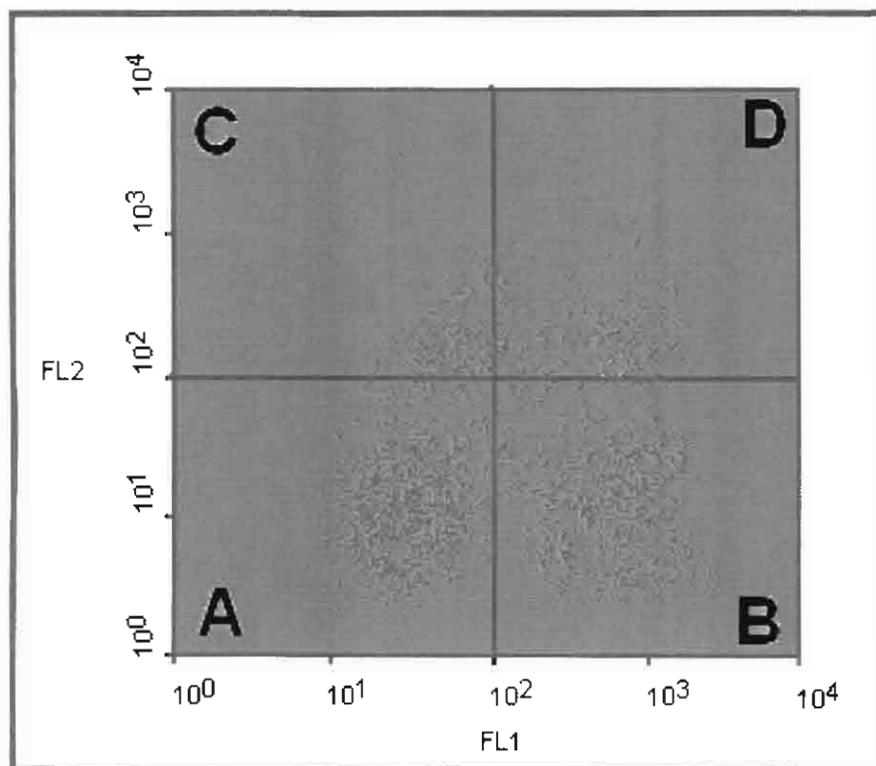
X.- Resultados.

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.

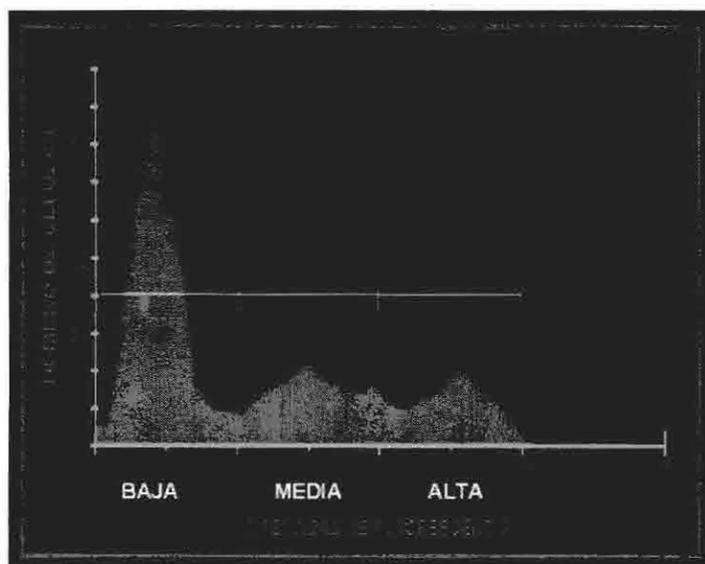
El análisis experimental de la fluorescencia emitida por la Anexina V-FITC unida a espermatozoides (Fluorescencia 1), se realizó mediante histogramas (figura 2) en los cuales, se puede observar de manera clara la existencia de tres poblaciones de células con distintas intensidades de fluorescencia.

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.

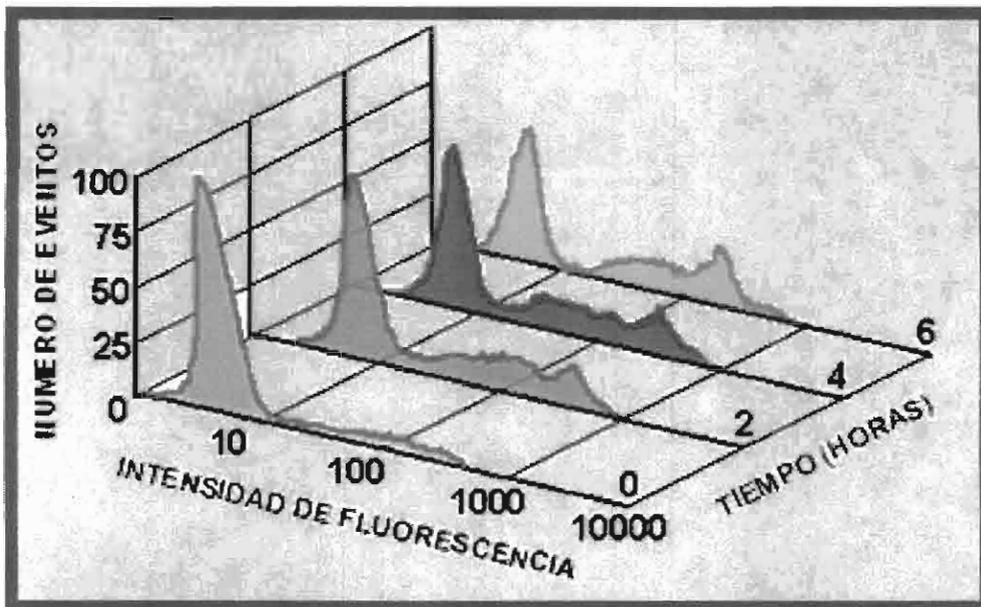
Tiempo (Horas)	n	Fluorescencia roja	Intensidades de Fluorescencia FL1 (promedio +/- desviación estándar)		
			(1-10)	(10 -100)	(>100)
0	5	8 ± 2.4	*78.4 ± 3.1 ^a	**12.0 ± 2.0 ^a	**10.6 ± 4.3 ^a
2	5	10 ± 3.2	*68.6 ± 6.7 ^a	**16.2 ± 2.1 ^b	**15.2 ± 3.2 ^a
4	5	11 ± 3.1	*64.2 ± 6.5 ^b	**17.6 ± 0.9 ^b	**18.2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

n = número de casos

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

n = número de casos

^{a-g} Diferentes letras indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre los datos de la misma columna. Prueba ANOVA plus Tukey.

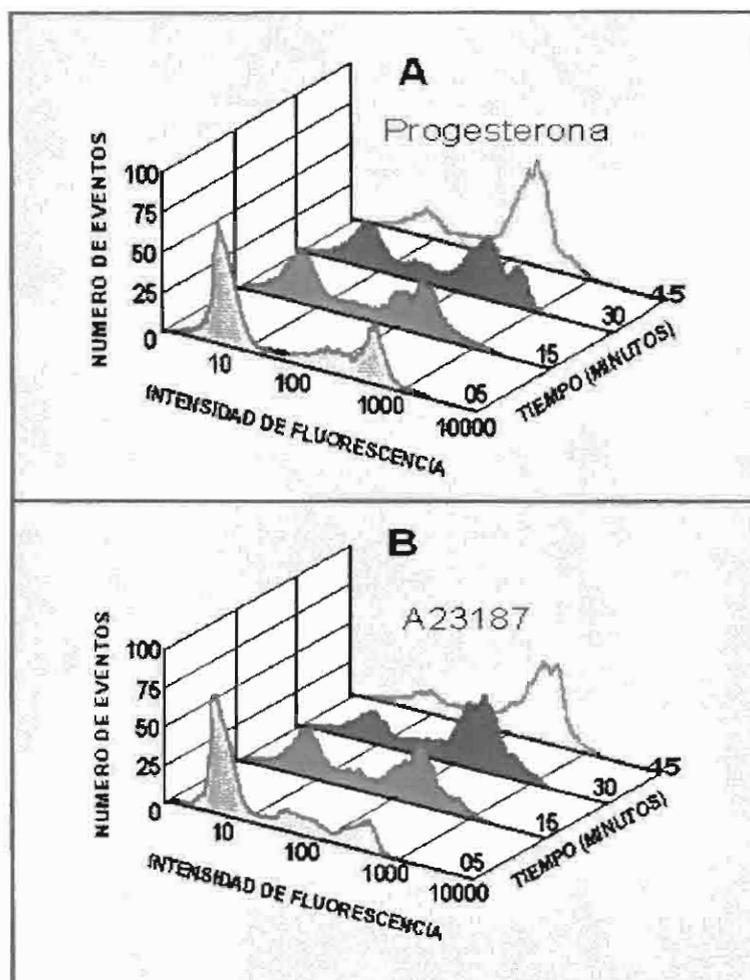
*,**,*** Diferente número de asteriscos indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre los datos del mismo renglón. Prueba t de Student.

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).

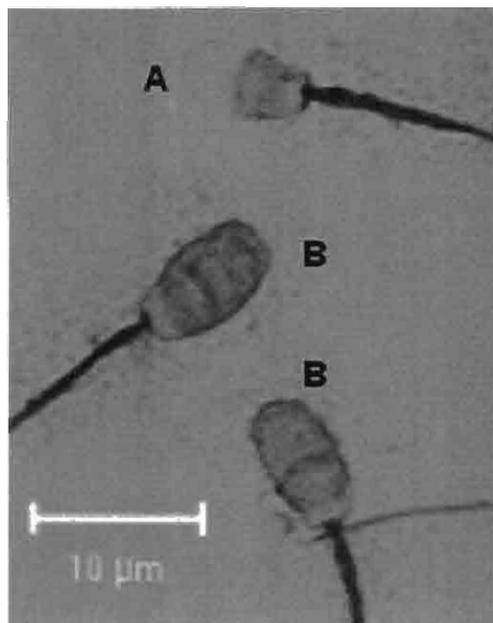
La evaluación de la reacción acrosomal con azul de Coomassie de los espermatozoides capacitados e inducidos a la RA con progesterona, A23187 y sin inductor, dieron como resultados los siguientes porcentajes de espermatozoides reaccionados: 34 ± 5 , 30 ± 4 y 5.3 ± 2 respectivamente a los 45 minutos de 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.

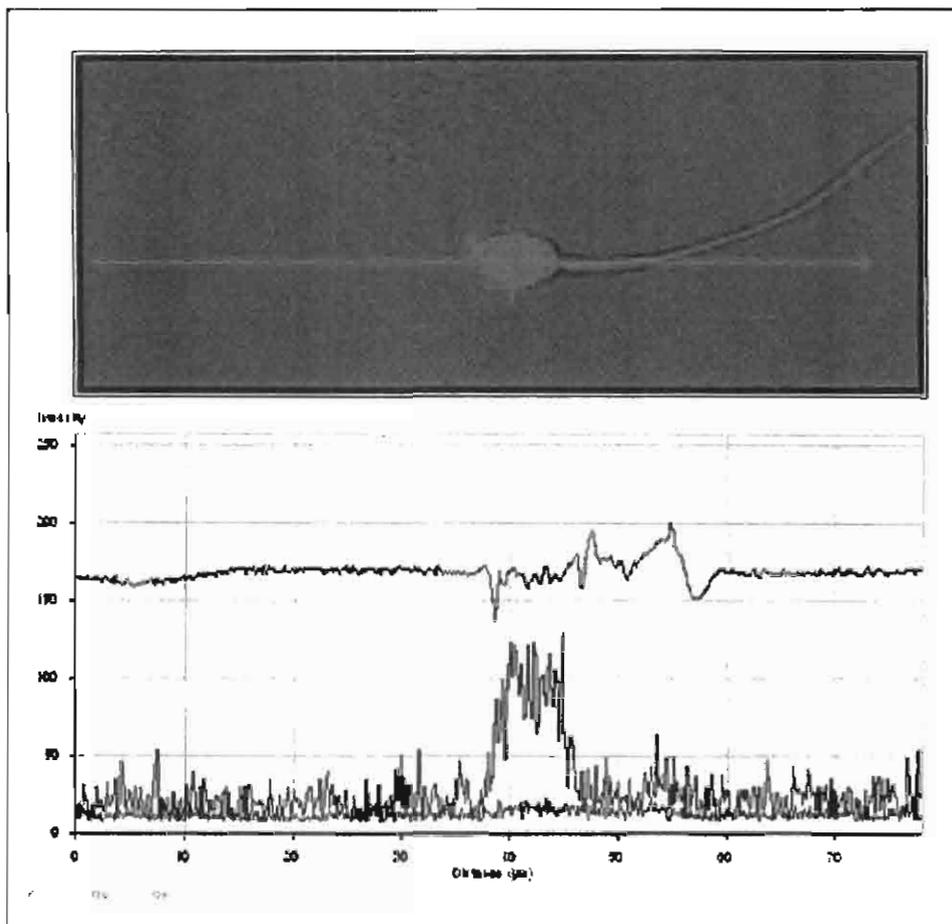


Análisis de citometría de flujo de Anexina V-FITC unida a espermatozoides, por histogramas, en espermatozoides capacitados durante la reacción acrosomal con progesterona (A) y con A-23187 (B). Se observan de manera fehaciente tres subpoblaciones distintas en intensidades de fluorescencia. La primera 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 < 10). Una segunda población intermedia (Intensidad de fluorescencia media > 10 y < 100), en la que la pérdida de la asimetría fue mayor, y una tercera población con la mayor intensidad de fluorescencia (Intensidad de fluorescencia alta > 100), 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.

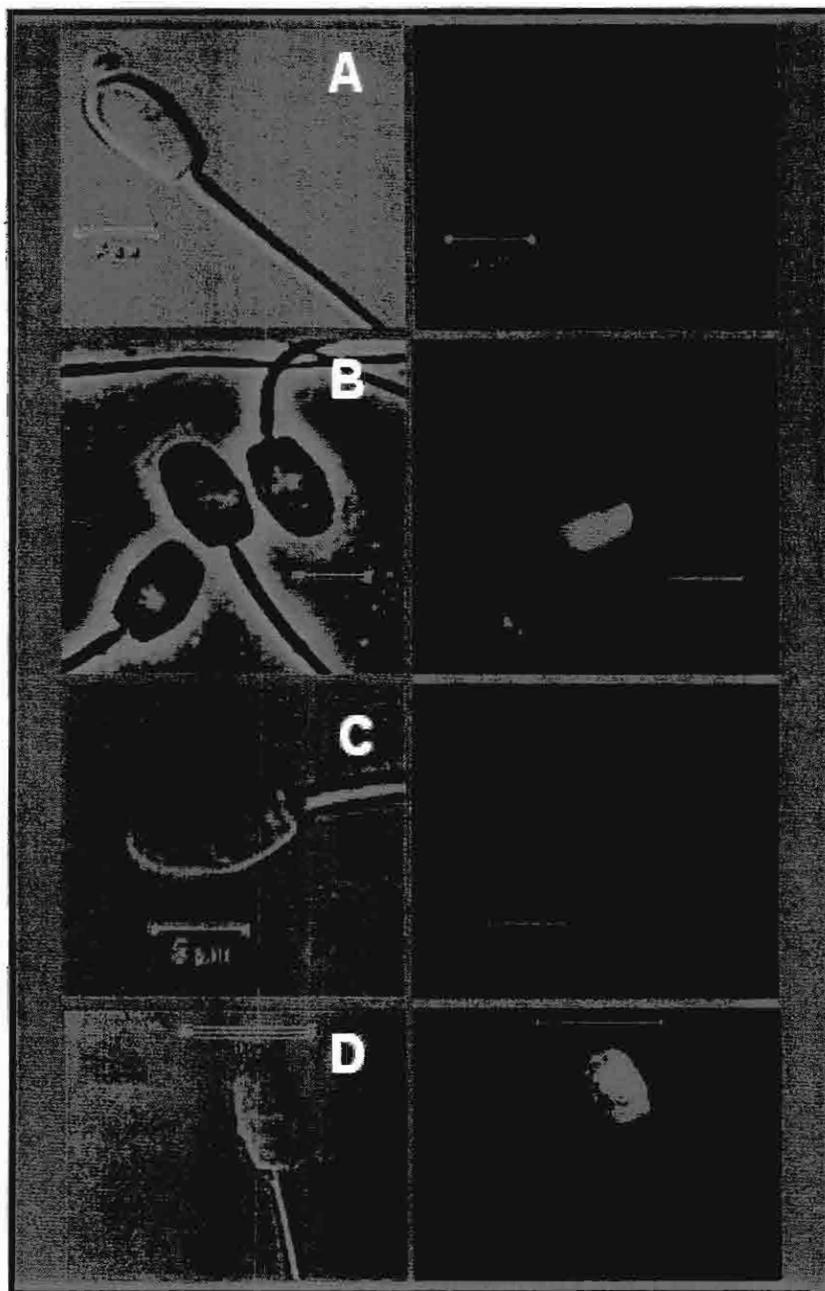


Escáner típico de microscopia confocal con intensidad de fluorescencia roja y verde, en espermatozoides capacitados con inducción de reacción acrosomal con A-23187. La intensidad de fluorescencia verde (Anexina- FITC) es indicada en la gráfica con una línea irregular, que se ve aumentada, cuando el escáner 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 7B), 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 7C 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 7D) 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 sin capacitar (7A) capacitados (7B), reaccionados con progesterona (7C) y con A-23187 (7D). En la fotografía 7C 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 7D) 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 adquiriera 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 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 8.8×10^6 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 o tantos como 5000. 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). 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_2 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^{2+} 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^{2+} citosólico, inducido por ionóforo A23187, o por incorporación de Ca^{2+} 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 Ca^{2+} , la progesterona tiene una función similar aumentando las concentraciones citosólicas de 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 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 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 $\mu\text{g/ml}$), 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 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; 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 Ca²⁺ 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*. 5(7):618-26.

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

Arnoult CRA., Cardullo RA., Lemos JR., Florman HM (1996). Activation of mouse sperm t-Type Ca²⁺ channels by protein by adhesion to the egg zona pellucida. *PNAS* 93: 13004-10

Ashraf M., Suleiman J., Ahmad M (1994). Ca²⁺ preconditioning elicits a unique protection against the Ca²⁺ paradox injury in rat heart. Role of adenosine. *Fixed. Circ Res*. 74(2):360-7.

Avelaño MI., Rotstein 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*. 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. Review. *Steroids*. 64(1-2):143-8.

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., Krausz Cs., Forti G (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 Concerní Singapore.
- Benoff S (1998). Voltage dependent calcium channels in mammalian spermatozoa. Review. *Front Biosci.* 1;3:D1220-40.
- Blackmore PF., Neulen J., Lattazio F., Beebe SJ (1991). Cell surface-binding sites for progesterone mediate calcium uptake in human sperm *J Biol Chem*, 28, 18655-18659.
- Bleil JD., 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 humanh 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.
- Brackett BG. y Oliphant G. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. 1975 *Biology of Reproduction* 12, 260-274 (1975).
- Brandelli A. (1997). Modulation of sperm acrosomal exocytosis by guanyl nucleotides and G-protein-modifier agents. *Biochem Mol Biol Int.* 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., Naor Z (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., Homby 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. Review. . *Rev Reprod.* Sep;4(3):135-42.
- Brouwers JFHM., Gadella BM., Van Golden LMG., Andielen AGM (1998). Quantitive 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.
- Dachary-Prigent J., Freyssinet JM., Pasquet JC., Carron AT Nurden L (1993). Annexin V as a probe of aminophospholipid exposure and platelet membrane vesiculation: a flow cytometry study showing a role for free sulfhydryl groups. *American Society of Hematology* 81:2554-2565,
- 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.
- Daleke, D. L. and Huestis, W. H (1985). Incorporation and translocation of aminophospholipids in human erythrocytes. *Biochemistry* 24, 5406-5416.
- Devaux PF., Zachowski A., Morrot G., Cribier S., Fellman P., Geldwerth D., Bitbol M., Herve P., (1990). Control of the transmembrane phospholipid distribution in eukaryotic cells by aminophospholipid translocase. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 12:517-522
- Doherty CM, Tarchala SM, Radwanska E, De Jonge CJ. (1995). Characterization of two second messenger pathways and their interactions in eliciting the human sperm acrosome reaction. *J Androl.* 16(1):36-46.
- Dunina-Barkovskaya A. (1998). pH dependence of junctional conductance. *Membr Cell Biol.*11(6):793-801.
- Edwards RG., Ferguson LC., Coombs RRA. (1964). Blood group antigens on human spermatozoa. *J Reprod Fertil*; 7:153-61.
- Emiliozzi C., 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 Ca²⁺. *Febbs Lett* 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. *J. Biophys.* 61:347-357.

- Fazeli AR., Zhang BR., Steenweg W., Larsson B., Beyers MM., Van Den Broek J., Rodriguez-Martinez 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.
- Flesch FM., Colenbrander B., van Golde LM., Gadella BM. (1999). Capacitation induces tyrosine phosphorylation of proteins in the boar sperm plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun.* 262(3):787-92.
- Fraser LR., 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. Review. *Hum Reprod.* 13 Suppl 1:9-19.
- Frits M., Flesch FM., Barend M., Gadella. (2000). Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane 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., Endo M., Oba S., Suzuki L (1993). Effects of modulators of protein kinase C on human sperm capacitation. *Fertil Steril* 59: 1285-1290.
- Gadella BM. (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 (2000) The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development* 127, 2407-2420.
- 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 (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;91 (Pt 1):21-31.
- Garty NB., 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, Cockle SM, Watson PF, Fraser LR. 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., 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.

Harkema W., Visser I, Soede NM, Kemp B, Woelders H (2004). Capacity of boar spermatozoa to bind zona pellucida proteins in vitro in relation to fertilization rates in vivo. *Theriogenology* 15;61(2-3):227-38

Harrison RA., Mairet B., 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., Myles DG. (1996). Sperm surface protein PH-20 is bifunctional: one activity is a hyaluronidase and second, distinct activity is required in secondary sperm-zona binding. *Biol Reprod* 55: 80-86.

Ibarra B, Caston JR, Llorca O, Valle M, Valpuesta JM, Carrascosa JL. (2000). Topology of the components of the DNA packaging machinery in the phage phi29 prohead. *Mol Biol.* 19;298(5):807-15.

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.* 60(3):573-9.

Kaul G., Sing S., Gandhi KK., SR. (1997). Calcium requirement and time course of capacitation of goat spermatozoa assessed by chlortetracycline assay. *Andrologia.* 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, Punt EL, Barratt CL, Publicover SJ (2002). Zona pellucida and progesterone-induced Ca^{2+} signaling and acrosome reaction in human spermatozoa. *J Androl* 23: 306-315.

Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. (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. *Review. Steroids.* May;64(5):310-9.

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 JY., 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 20(1):126-34.
- Leclerc P., de Lamirande E., 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., Saling PM (1992). Regulation of mouse gamet interaction by a sperm tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89,11692-11695.
- Leyton L., 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 DS., Connor WE., Wolf DP., Neuringer M., Hachey DL. (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.* 24;1372(1):1-12.
- Lu Q., 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+ channels in the hamster sperm acrosome reaction. *J Exp Zool.* 1994 1;269(5):484-8.
- Llanos MN., Morales P., 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.* 23;232(4753):1004-7.
- Mann T., 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.* 44(4):313-20.
- McLeskey SB., Dowds C., Carballada R., White RR., Saling PM. (1998). Molecules involved in mammalian sperm-egg interaction. Review. *Int Rev Cytol.* 177:57-113..
- Meers P, Mealy T. (1994). Phospholipid determinants for annexin V binding sites and the role of tryptophan 187. *Biochemistry* 17;33(19):5829-37.
- Meizel S, Turner KO (1991). Progesterone acts at the plasma membrane of human sperm. *Mol Cell Endocrinol.* 77(1-3):R1-5.

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.* 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⁻ 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.* 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, Gong X, Shur BD (1993). Sperm require β -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.

Muller K, Pomorski T, Muller P, Zachowski A, Herrmann A (1994). Protein-dependent translocation of aminophospholipids and asymmetric transbilayer distribution of phospholipids in the plasma membrane of ram sperm cells. *Biochemistry* 23;33(33):9968-74.

Müller P., Pomorski T., Porwoli S., Tauber R., 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. Review. *J Reprod Fertil Suppl.* 50:25-34.

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.* 71(5):919-23.

Naz RKK., Ahmad R., Kumar A. (1991). Role of membrane phosphotyrosine proteins in human spermatozoa function. *J Cell Sci* 99, 157-165

Nolan JP., Hammerstedt RH. (1997). Regulation of membrane stability and acrosome reaction in mammalian sperm. *FASEB J* 11: 670-682.

Nolan JP., Magargee SF., Posner RG., Hammerstedt R. (1995). Flow cytometric analysis of transmembrane phospholipid movement in bull sperm. *Biochemistry* 33, 9968-9974

Oehninger S., Patankar M., Sépala M., Clark GF. (1998). Involvement of selectin-like carbohydrate binding specificity in human gamete interaction. *Andrologia.* 30(4-5):269-74.

Okamura N., 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., 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.

Opden-Kamp JA. (1979). Lipid asymmetry in membranes *Annu. Rev. Biochem.* 48:47-71.

Osheroff JE., Visconti PE., Valenzuela JP., Travis JA., Alvarez J., 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., Meizel S. (1989). Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun*, 160, 828-833.

Ozgun 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., Hammerstedt RH. (1985). Developmental changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. *Biol. Reprod.* 32: 653-668.

Pigault C, Follenius-Wund A, Schmutz M, Freyssinet JM, Brisson A. (1994). Formation of two-dimensional arrays of annexin V on phosphatidylserine-containing liposomes. *J Mol Biol.* 1994 Feb 11;236(1):199-208

Prasad SV., Wikins B., Dumber 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.* 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., 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, Murase T, Shi QX. (1994): Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida. *Science* 266: 1578-1581.

Rosales-Torres, A.M., Avalea-Rodríguez, A., Vergara-Onofre, M., Hernández-Pérez, O., Bellesteros, L.M., Garcia-Macedo, R., Ortiz-Navarrete, V. y Rosado, A. (2000). Multiparametric study of atresia in ewe antral follicles: Histology, flow cytometry, internucleosomal DNA fragmentation, and lysosomal enzyme activities in granulosa cells and follicular fluid. *Mol Reprod and Develop* 55: 270.

Rufo GA Jr., Schoff PK, Lardy HA. (1984). Regulation of calcium content in bovine spermatozoa. *J Biol Chem.* 25.;259(4):2547-52.

Rufo GA Jr., Singh JP., Babcock DF., Lardy HA. (1982). Purification and characterization of a calcium transport inhibitor protein from bovine seminal plasma. *J Biol Chem.* 25;257(8):4627-32.

Ruknudin A., Silver IA. (1990). Ca²⁺ uptake during capacitation of mouse spermatozoa and the effect of an anion transport inhibitor on Ca²⁺ uptake. *Mol Reprod Dev.* 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., Overstreet JW. (1997). The PH-20 protein in human spermatozoa. *J. Androl.* 18: 151-158.
- Saling PM., Storey BT. (1979). Mouse Gamete interactions during fertilization *in vitro*: cholortetracycline 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., Deuticke B. (1986). Bacterial cytotoxins, amphotericin B and local anesthetics enhance transbilayer mobility of phospholipids in erythrocyte membranes. Consequences for phospholipid asymmetry. *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., Devaux PF. (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, Evans S, Lu Q. Cell surface galactosyltransferase. In *Guidebook to the Extracellular Matrix and Adhesion Proteins.* Glycoconj J. 1998 Jun;15(6):537-48.
- 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., White JM. (1996). The molecules of mammalian fertilization. *Cell* 85, 629-637.
- Sopkova J, Gally J, Vincent M, Pancoska P, Lewit-Bentley A. (1994). The dynamic behavior of annexin V as a function of calcium ion binding: a circular dichroism, UV absorption, and steady-state and time-resolved fluorescence study. *Biochemistry.* 19;33(15):4490-9.
- Stuart MC., Reutelingsperger CP., Frederik PM (1998). Binding of annexin V to bilayers with various phospholipid compositions using glass beads in a flow cytometer *Cytometry* 33(4):414-9.
- Suarez SS., Meizel S., 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). Intracellular calcium reaches different levels of elevation in hyperactivated and acrosome-reacted hamster sperm. *Mol. Reprod. Dev.* 42, 325
- Sugimura M, Donato R, Kakkar VV, Scully MF (1994). Annexin V as a probe of the contribution of anionic phospholipids to the procoagulant activity of tumour cell surfaces. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 5(3):365-73.

Sulpice JC., Alain Z., Philippe FD., Francoise G. (1994). Requirement for phosphatidylinositol 4,5-Biphosphate in the Ca²⁺ 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. Biol Reprod 69:1408–1415.

Tomes CN., McMaster CR., Saling PM. (1996). Activation of mouse sperm phosphatidylinositol-4,5 biphosphate-phospholipase C by zona pellucida is modulated by tyrosine phosphorylation. Mol Reprod Dev 43(2):196-204.

Topfer-Petersen E., Romero A., Varela PF., Ekhlas-Hundrieser M., Dostalova Z., Sanz L., Calvete JJ., (1998). Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. Review. Andrologia. 30(4-5):217-24.

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. J Immunol Method 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 58(2):483-9.

Visconti PE., 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., 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.

Westwbroek RE., Babcock DF. (1999). Discrete regional distributions suggest diverse functional roles of calcium channel alpha1 subunits in sperm. Dev Biol. 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. 31(4):297-306.

Williamson, P.; Kulick, A.; Zachowski, A.; Schlegel, RA and Devaux, PF. Biochemistry. (1992). Ca⁺⁺ 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.


[Shopping Cart](#) [Help](#) [Contact Us](#) [Menu](#)
[Log Off uamm](#)

Resources

- [Home + Quick Search](#)
- [Alphabetical Listing](#)
- [Journals by Subject](#)
- [For Authors](#)
- [For Librarians](#)
- [FAQs](#)
- [My Account](#)
- [My Files](#)
- [SARA \(Contents Alerting\)](#)
- [Support Information](#)
- [Library Recommendation Form](#)
- [Linking Options](#)

Article


[Back To: Main](#) [Publication](#) [Issue](#)

Archives of Andrology

Publisher: Taylor & Francis Health Sciences, part of the Taylor & Francis Group

Issue: Volume 50, Number 4 / July-August 2004

Pages: 273 - 285

URL: [Linking Options](#)

FLUOROMETRIC STUDY OF RABBIT SPERM HEAD MEMBRANE PHOSPHOLIPID ASYMMETRY DURING CAPACITATION AND ACROSOME REACTION USING ANNEXIN-V FITC

A. ÁVALOS-RODRÍGUEZ ^{A1}, A. R. ORTÍZ-MUÑOZ ^{A2}, C. ORTEGA-CAMARILLO ^{A3}, M. VERGARA-ONOFRE ^{A4}, A. ROSADO-GARCÍA ^{A5}, A. M. ROSALES-TORRES ^{A4}

^{A1} Unidad Xochimilco, Departamento de Producción Agrícola y Animal, Laboratorio de Bioquímica de la Reproducción, Alumno del Doctorado en Ciencias Biológicas, División de CBS UAM Xochitl., Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico

^{A2} Unidad Iztapalapa, Departamento de Biología Experimental, Laboratorio de Biología Celular y Citometría de Flujo, Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico

^{A3} Instituto Mexicano del Seguro Social, CMN sXXI, Hospital de Especialidades, Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Mexico

^{A4} Unidad Xochimilco, Departamento de Producción Agrícola y Animal, Laboratorio de Bioquímica de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico

^{A5} Unidad Iztapalapa, Departamento de Biología de la Reproducción, Laboratorio Manejo de Gametos, Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico

Abstract:

This study was conducted to evaluate

Full Text Access

Full Text Secured

The full text of this article is secured to subscribers. To gain access, you may:

- [Subscribe to this publication.](#)

[Subscribe](#)

- [Add this item to your shopping cart for purchase later.](#)

[Add to Shopping Cart](#)

- [Purchase this item now.](#)

[Purchase Item Now](#)



phosphatidylserine translocation in head plasma membrane of Percoll-gradient purified of 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 fluorocytometry 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.

Keywords:

acrosome, Annexin-V, asymmetry, capacitation, FITC, fluorometnc, phospholipid, reaction

The references of this article are secured to subscribers.



Please Note: By using this site you agree to our [Terms and Conditions of Access](#)

Taylor & Francis Group

London • New York • Oslo • Philadelphia • Singapore • Stockholm

UK Head Office: 11 New Fetter Lane, London EC4P 4EE

Email **Webmaster**

Remote Address: 148.206.110.28 • Server: MPWEB05

HTTP User Agent: Mozilla/4.0 (compatible; MSIE 6.0; Windows NT 5.1; FunWebProducts)

FLUOROMETRIC STUDY OF RABBIT SPERM HEAD MEMBRANE PHOSPHOLIPID ASYMMETRY DURING CAPACITATION AND ACROSOME REACTION USING ANNEXIN-V FITC

A. ÁVALOS-RODRÍGUEZ¹, A. R. ORTÍZ-MUÑÍZ²,
C. ORTEGA-CAMARILLO³, M. VERGARA-ONOFRE⁴,
A. M. ROSALES-TORRES⁴ and A. ROSADO-GARCÍA⁵

¹*Alumno del Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco-Iztapalapa*

²*Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Laboratorio de Biología Celular y Citometría de Flujo*

³*Instituto Mexicano del Seguro Social, Hospital de Especialidades, Unidad de Investigación Médica en Bioquímica*

⁴*Departamento de Producción Agrícola y Animal, Laboratorio de Bioquímica de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco*

⁵*Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Departamento de Biología de la Reproducción*

This study was conducted to evaluate phosphatidylserine translocation in head plasma membrane of Percoll-gradient purified of 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 fluorocytometry 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

Keywords acrosome, Annexin-V, asymmetry, capacitation, FITC, fluorometric, phospholipid, reaction

This research was supported in part by grant #37767-B from CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) México and grant 985228 from FOMES.

Address correspondence to A. M. Rosales Torres, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Departamento de Producción Agrícola y Animal, Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, Delegación Coyoucan, México, D.F., C.P. 04960 Edificio 34-2° piso. E-mail: anamaria@cueyatl.uam.mx

INTRODUCTION

To be able to fertilize the egg, mammalian sperm must be previously capacitated [29]. Under normal physiological conditions capacitation takes place after ejaculation in the female reproductive tract, but it can be induced in vitro by sperm incubation in specially developed media. Bicarbonate/CO₂ appears particularly responsible for inducing capacitation [11, 15], although Ca²⁺ and albumin seem to be also necessary [29]. Bicarbonate induces changes in the lipid architecture of the sperm plasma membrane due to phospholipids scrambling [11, 28]. Capacitation modifies the lipid structure of the plasma membrane [28], making it more fluid by the release of cholesterol and inducing alterations in the normal distribution of the phospholipids in the bilayer, increasing phospholipid scrambling and decreasing the normal asymmetry of this structure [10]. These surface changes not only enable the sperm cell to bind to the extra cellular coat that covers the egg, but prepare the more drastic modifications that occur during the acrosome reaction to permit the release of the enzymatic machinery for sperm penetration through the zone pellucida [3].

The molecular mechanisms that participate in the processes of capacitation and acrosome reaction are only partially defined. Proteins present in the zone pellucida, particularly ZP3, appear to be the physiological inducers of sperm acrosome reaction. However, numerous activators of capacitation and the acrosome reaction have been experimentally proposed [3, 29], and physiological and experimental induction of acrosome reaction may be produced by several different molecular mechanisms [4, 5]. Calcium seems to play a central role in acrosome reaction and membrane fusion processes in sperm and calcium ionophores, mainly A23187, remain some of the most widely used non physiological inducers of AR [29]. Indeed, high concentrations, millimolar, of extracellular calcium are essential to ZP3 induced sperm exocytosis [9]. However, some agonists like ATP or platelet-activation factor, can induce acrosome reaction in the absence of extracellular calcium [3].

Several complex interactions must occur in sperm plasma membranes to ensure unsuccessful fertility at receptor, adhesive and fusion properties; molecular composition and architecture; and membrane derived signaling. These membrane changes are not only sequence specific, but also region specific [20]. Sperm zone pellucida binding seems to occur at the apical surface of the sperm; acrosome reaction comprehends the anterior, acrosomal, half of the head membrane, while sperm-egg binding must involve only the post-acrosomal region of the sperm head plasma membrane. The little that is known about the structural changes that occur in the sperm membrane is its sequence and regionalization(

Flow cytometry study of Annexin-V binding to cell membranes is derived from its selective affinity for negatively charged phospholipids. Under defined salt and calcium concentration, Annexin-V selectively binds to phosphatidylserine (PS) over most other phospholipids species [18]. The K_d for the binding of Annexin-V to PS is about 5×10^{-10} M [18]. This is the basis for the use of Annexin-V as a tool to monitor phospholipid scrambling and membrane asymmetry in experimental studies. The number of binding sites for Annexin-V has been reported as $6-24 \times 10^6$ /cell in tumor cells and 8.8×10^6 /cell for endothelial cells. Normal human red cells may have as few as 276 binding sites, while resting platelets have 5000 binding sites. The stoichiometry of Annexin-V binding to PS

ranges between 4 to 8 Annexin-V molecules per one PS molecule as judged by phosphatidylserine-containing liposomes [18].

In this study, the regional and time dependent changes in membrane phospholipids asymmetry epididymal sperm cells submitted to in vitro capacitating and acrosome reaction inducing environments, and the specific binding of Fluorescein Isothiocyanate (FITC) conjugated Annexin-V binding to phosphatidylserine, was applied to flow fluorocytometry and by Confocal Microscopy.

80

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and Reagents

Chlortetracycline (CTC), Coomassie brilliant blue G-250 (CBB), HEPES (N-(2-hydroxyl-ethyl), piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)), sodium pyruvate, Tris (tris-(hydroxyl-methyl) aminomethane), sodium lactate, D-(+) glucose, Percoll, bovine serum albumin (fatty acids free), and other salts were purchased from Sigma Chemical Co (St. Louis, Missouri, USA). Calcium ionophore A23187 was purchased from Boehringer-Mannheim (Germany). All other reagents were analytical grade or better. Stock solutions of Progesterone and A23187 were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) and stored and checked as indicated by Roldan [24] and by Köhn [17], respectively. The final concentration of DMSO in the assay mixtures never exceeded 0.1%, and the processed control samples without A23187, or without progesterone, contained the appropriate concentrations of DMSO.

85

90

95

Incubation media were: medium A (30 mM HEPES, 5 mM KCl, 100 mM NaCl, 21 mM sodium lactate, 2.5 mM sodium pyruvate, all adjusted to pH 7.6); enriched medium A (30 mM HEPES, 5 mM KCl, 84 mM NaCl, 21 mM sodium lactate, 2.5 mM sodium pyruvate, 13.9 mM glucose, fatty acids-free bovine serum albumin 1 mg per ml, all adjusted to pH 7.6); and capacitating medium A (enriched medium A plus 2.5 mM CaCl_2).

100

Fertile, mature male New Zealand white rabbits 10–12 months old were sacrificed and cauda epididymal sperm were obtained by perfusion of the cauda epididymus through the deferent duct using 3 ml medium A. Epididymal sperm suspensions were centrifuged, $900 \times g$ for 20 min, through a two-phase Percoll gradient (95% and 75% Percoll diluted in Medium A) [26]. Motile sperm were recovered and washed by centrifugation at $500 \times g$ for 5 min, and counted and suspended in either enriched medium A (controls) or in capacitating medium A to a final concentration of 2.5×10^7 sperm cells/ml. Sperm suspensions were incubated for 6 h at 37°C with mild shaking in loosely capped polypropylene conical centrifuge tubes under a 5% CO_2 / 95% air atmosphere. After capacitation, 25 μl duplicated aliquots of sperm suspensions were used to evaluate viability by the eosin/nigrosin method, and motility by direct microscopy. Duplicated aliquots of sperm suspensions (25 μl) were also used to evaluate the percentage of capacitated sperm by chlortetracycline (CTC) binding [13]. Chlortetracycline fluorescence binding to rabbit sperm and the percentage of capacitated sperm at the different studied times were similar to that previously described [12]. Control sperm, incubated in Ca^{2+} free medium, were scarcely fluorescent. Capacitated sperm were brightly fluorescent, particularly on the anterior, acrosomal region, of the sperm.

105

110

115

Each remaining of the cell suspensions was divided into two aliquots. Each of these aliquots was further divided into two new aliquots, one control and one experimental, to induce the acrosomal reaction as described below. In this way, acrosomal reaction in the total absence of any inducing agent, as well as under the continuous presence of A23187 or Progesterone, were studied. 120

The acrosome reaction was induced, either by the addition of 100 μ l of the A23187 diluted stock solution to reach a final concentration of 10 μ M of the ionophore, or by the addition of progesterone, 3.18 μ M final concentration and the incubation was continued under the same conditions. After 5, 15, 30 and 45 min at 37°C samples of the sperm suspensions were studied by flow cytometry [12], the percentage of acrosome reacted sperm was determined by the CBB staining [23]. Chlortetracycline evaluation of the percentage of capacitated sperm and assessment of acrosomal reaction, using coomassie brilliant blue staining, were done [12]. Percentage of capacitated rabbit spermatozoa (CTC staining) after 6-hour incubation in a medium containing 2.5 mM Ca^{2+} was 71 ± 6 (mean \pm Sd). Previously capacitated epididymal spermatozoa showed a linear time-increase in the percentage of acrosomal reactions induced by either Progesterone or A23187 reaching 34 ± 5 , and 30 ± 4 (mean \pm Sd), respectively, after 45 min of incubation [22]. 125 130 135

The changes induced in membrane asymmetry during capacitation and the acrosomal reaction were studied by flow-fluorocytometry using a commercial kit of Fluorescein Isothiocyanato (FITC) conjugated Annexin-V (Annexin-V Fluos, Boheringer Mannheim catalog number 1828681) to detect the translocation of PS from the inner to the outer leaflet of the plasma membrane following with only small modifications the procedure recommended by the manufacturer. To check for membrane damaged sperm, 1 μ l of PI (50 mg/ml) was added to the samples. After the addition of the Annexin-V reagent, samples were incubated in the dark during 15 min at room temperature, taken to 500 μ l and analyzed using a FACSort (Becton Dickinson System, San Jose, CA) cytofluorometer. FSC-H value was 44 and FSC was set at E00. 140 145

The green fluorescence (Annexin-FITC) was detected with PMT2 (behind 550 DL and 525 BP filters) and the red fluorescence (PI) with PMT4 (behind 600 DL and 575 BP filters) Fluorescent intensity at 530 nm was measured in a minimum of 10,000 [2] sperm cells. Fluorescence intensity was registered logarithmically and the range divided into four sections. The results obtained from 10,000 cells were analyzed using the Lysis II program registering the percent of sperm in each of the four fluorescence intensity quadrants. To diminish, or suppress, the effect of cell death during the experimental procedures, the quantitative results of Annexin-V binding in this study were done taking exclusively those cells in the low or nil red fluorescence quadrants. Confocal microscopy was performed in a Zeiss Axiovert 100 M microscope, using 488 nm excitation and 505 and >560 nm emission wavelengths for annexin and PI, respectively. 150 155

Acrosome-reacted sperm can be easily identified by the CBB method [12]. Blue staining of the acrosomal region, forming a distinct apical ridge, indicates intact acrosomes of unreacted sperm. In most cases of unreacted sperm persistence of acrosome was accompanied by increase staining of all the anterior half, acrosomal region, of the sperm with a distinct band in the equatorial region. Lack of blue staining was interpreted as characteristic of acrosomal-reacted sperm. 160

Two subpopulations of sperm cell events were studied, one not stained with PI (viable) and the other stained with this compound (unviable cells) both showing FITC-Annexin-V fluorescence (capacitating or acrosome reacting cells). The first group sperm cell (viable) were also sorted and collected immediately on microscopic slides for subsequently evaluation with spectral confocal microscopy. 165

Statistical analyses were done using the Sigma Stat v2.0 package (Sigma-Aldrich Co., San Louis, Missouri, USA). AR percentages were transformed to arcsines of their square roots [25], the transformed data analyzed by two ways ANOVA and two-tailed Dunnet t-test. F values corresponding to $p < 0.05$ were considered significantly different. 170

RESULTS

Sperm exposed to Annexin-V-FITC take up the dye rapidly reaching a plateau ~ 10 min after incubation at 37°C in the dark (Figure 1). Fluorescence in the Annexin fluorescence quadrants was always predominant, even after 30 min incubation of the sperm in the presence of A23187. The percentage of sperm cells showing significant levels of red fluorescence (quadrants A and B), although increasing with time under all the experimental conditions, was never superior to 35% of the total number of sperm stained. The sperm cells that have already gone through the acrosome reaction were included within this increasing sperm population. 175
180

Flow cytometry analysis of Annexin-V binding to sperm (green fluorescence) consistently demonstrates three distinct subpopulations whose contribution to the total fluorescence intensity varies with the incubation medium (capacitating or acrosome reaction inducing), with the inductor (Progesterone, A23187), and with the incubation time. One population corresponds with those sperm that have not changed their membrane asymmetric properties and therefore do not bind Annexin (fluorescence intensity < 10), a second population show middle ($10 > < 100$), and a third population high fluorescence intensities (> 100). At the end of the incubation period there is a small but significant increase in the amount of sperm cells showing high intensity fluorescence and, therefore, a significant decrease in plasma membrane asymmetry (Table 1). 185
190

Acrosome reaction induction with Progesterone or A23187 showed, in general, the same changes in intensity of fluorescence during the 45 minutes of incubation (Table 2 and Figure 2). However fluorescence intensity under the influence of progesterone showed no significant changes between 30 and 45 minutes incubation, while the highest intensity of fluorescence was produced by 45 minutes incubation of sperm cells in the presence of A23187. 195

The pattern of fluorescence intensity in sperm cells incubated in the presence of progesterone characteristically showed a biphasic curve in the range of 100–1000 intensity between 5 and 30 minutes after the addition of the hormone (Figure 2). This biphasic character was lost after 45 min incubation. Acrosome reaction induction in the presence of ionophore never showed this biphasic appearance (Figure 2). This difference in fluorescence pattern induced us to study the changes in membrane asymmetry during the induction of the acrosome reaction using confocal microscopy (Figures 3,4). 200

All cells observed by confocal microscopy were scanned (Figure 3) and only those showing no red fluorescence (low line in Figure 3) were taken in account. The small fluorescence increase after 6 hours incubation under capacitating conditions was basically 205

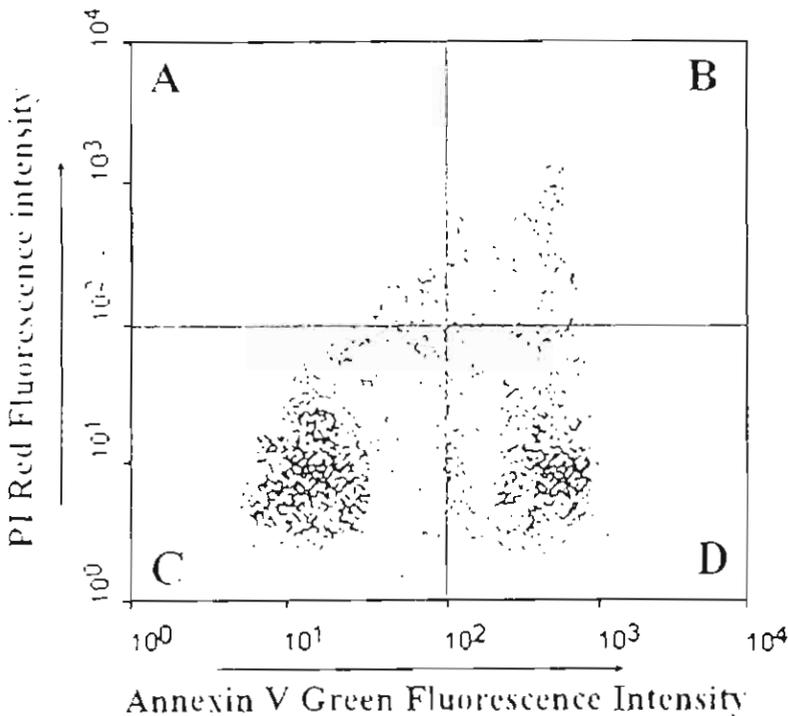


Figure 1. Flow cytometric profile of green versus red fluorescence of fresh rabbit epididymal sperm labeled with Annexin-V and PI after 30 min incubation in presence of A23187. a) Dead or dying sperm cells labeled with PI but not with Annexin-V-FITC. b) Cells with significant levels of green/red fluorescence, probably apoptotic, necrotic or already acrosome reacted sperm. c) Nonfluorescent, fully viable cell. d) Spermatozoa labeled with Annexin-V-FITC but not with PI. Sperm suspensions were first incubated for 6 h at 37°C with mild shaking in capacitating medium A in capped tubes under a 5% CO₂/95% air atmosphere. Then an aliquot of sperm suspension was incubated in presence of A23187, final concentration of 10 μM, in the presence of Annexin-V-FITC and propidium iodide. Green fluorescence (Annexin-FITC) was detected with PMT2 (behind 550 DL and 525 BP filters) and red fluorescence (PI) with PMT4 (behind 600 DL and 575 BP filters).

due to the presence of fluorescence in the post-acrosomal region of the sperm head (Figure 4a); only sperm cells with no red fluorescence were included in these studies. This indicates that during this incubation period a small change in membrane asymmetry has been produced in the post-acrosomal membrane of the sperm cells.

The biphasic character of the fluorescence intensity in the sperm cell in which the acrosomal reaction was induced by progesterone can be explained by the differential staining induced by this hormone in the acrosomal cap of the sperm cells. Figure 4b show two clear bands of fluorescence of different intensities induced by progesterone; A brilliant one in the equatorial limit of the acrosome region and a weaker one present in all the rest of the acrosome. On the contrary (Figure 4c), A23187 action on the sperm induced a homogeneous fluorescence over all of the acrosome region and a small fluorescence over the post-acrosomal region of the sperm head.

210

215

Table 1. Annexin-V-FITC fluorescent intensity at 530 nm of sperm cells incubated in capacitating medium A mean \pm the standard deviation (n = 5 for each entry)

TIME (Hours)	Red fluorescence	Green fluorescence (Taken to 100%)		
		Fluorescent intensity (1-10)	Fluorescent intensity (10-100)	Fluorescent intensity (> 100)
0	8 \pm 2.4	*78 \pm 3.1 ^a	**12 \pm 2.0 ^a	**10 \pm 4.3 ^a
2	10 \pm 3.2	*68 \pm 6.7 ^a	**16 \pm 2.1 ^b	**15 \pm 3.2 ^a
4	11 \pm 3.1	*64 \pm 6.5 ^b	**17 \pm 0.9 ^b	**18 \pm 4.0 ^{a,b}
6	13 \pm 4.0	*59 \pm 7.3 ^b	**18 \pm 4.8 ^b	**24 \pm 3.4 ^c

*-^adifferent superscript letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between the data in the same column ANOVA plus Tukey.

*, **, *** Different numbers of asterisks indicate significant differences ($p < 0.05$) between data in the same row. Student's t test.

DISCUSSION

Annexin-V belongs to the family of calcium-dependent phospholipids binding proteins and binds almost solely to phosphatidylserine. When Annexin V is used to detect loss of membrane asymmetry in cellular systems, the binding properties of the experimental conditions are of importance.

When recently obtained epididymal sperm were incubated with progesterone, the steroid did not stimulate AR. Progesterone alone did not stimulate the AR unless the

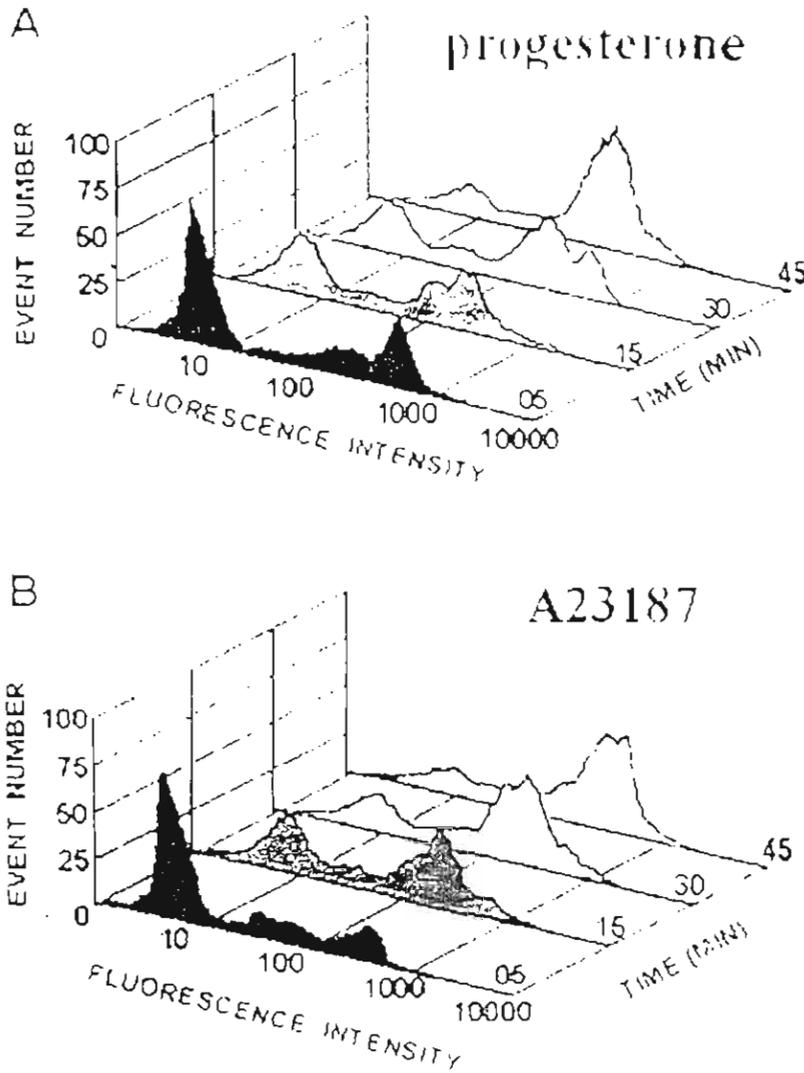
220

Table 2. Annexin-V-FITC fluorescent intensity at 530 nm of sperm cells during the acrosome reaction (only quadrants with low or nil red fluorescence were included) mean \pm the standard deviation (n = 5 for each entry)

Acrosome reaction inducer	Time (min)	Fluorescent intensity (0-10)	Fluorescent intensity (10-100)	Fluorescent intensity (>100)
None	5	*69 \pm 4.4 ^a	**20 \pm 3.4 ^a	**11 \pm 5.9 ^a
	15	*65 \pm 3.6 ^a	**20 \pm 2.6 ^a	**15 \pm 4.1 ^a
	30	*58 \pm 2.3 ^b	**19 \pm 1.9 ^a	**22 \pm 3.1 ^b
	45	*53 \pm 4.4 ^b	**17 \pm 1.7 ^a	***29 \pm 3.9 ^c
Progesterone	5	*60 \pm 5.2 ^{a,b}	**15 \pm 4.2 ^a	***34 \pm 1.5 ^d
	15	*30 \pm 1.6 ^c	**24 \pm 3.6 ^a	***45 \pm 4.1 ^e
	30	*26 \pm 5.2 ^c	*20 \pm 3.2 ^a	**55 \pm 6.9 ^f
	45	*16 \pm 5.4 ^c	*23 \pm 6.2 ^a	**62 \pm 2.3 ^f
A23187	5	*58 \pm 6.4 ^a	**24 \pm 5.8 ^a	**20 \pm 2.9 ^b
	15	*38 \pm 3.1 ^c	**25 \pm 4.5 ^a	*36 \pm 3.9 ^d
	30	*22 \pm 6.9 ^{c,d}	*18 \pm 7.8 ^a	**59 \pm 3.5 ^f
	45	*13 \pm 8.6 ^d	*21 \pm 8.3 ^a	**69 \pm 3.4 ^g

*-^adifferent superscript letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between the data in the same column. ANOVA plus Tukey.

*, **, *** Different numbers of asterisks indicate significant differences ($p < 0.05$) between data in the same row. Student's t test.



Q5

Figure 2. Cytofluorometric analysis (Becton Dickinson System FACSsort) of rabbit sperm stained with Annexin-V-FITC. Stained cells were excited at 488 nm and fluorescent emission was evaluated at 530 nm using proper band-pass filters. The figure represents the results obtained with pre-capacitated sperm incubated 5 to 45 minutes with $3.18 \mu\text{M}$ progesterone. a) With $10 \mu\text{M}$ A23187. b) Only cells obtained from two lower quadrants (green fluorescence) were analyzed using Lysys II program. Fluorescence intensity (in abscissa) was registered logarithmically indicating percent of sperm cells in each of four intensity quadrants. Ordinate indicates relative cell number. One experiment representative of 5 is shown.

epididymal sperm were previously incubated in capacitating conditions. However, when ejaculated sperm were preincubated (6 h) with capacitation medium A and then incubated 15 min with P ($3.18 \mu\text{g}/\text{ml}$), the percentage of AR obtained increased significantly (Table 2); these results are similar to those obtained in bovine sperm [27]. Calcium flux is induced specifically by progesterone in capacitated and uncapacitated sperm cells, whereas only

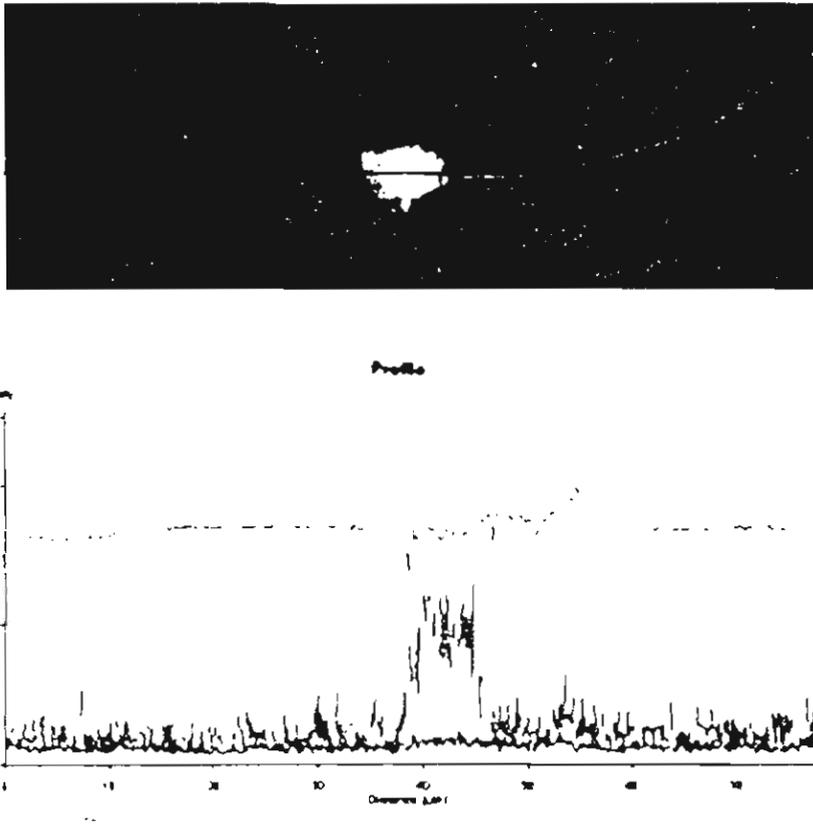


Figure 3. Typical confocal microscopy scan of green and red fluorescence intensities of an A23187 incubated sperm stained with Annexin-V and PI. The intensity of green fluorescence (Annexin-V-FITC) is indicated in upper highly irregular line corresponds to almost all sperm head. The scan for red fluorescence (PI) indicated by lower almost straight line was near zero in all sperm in this study.

capacitated sperm are able to subsequently complete the acrosome reaction. Incubation of human sperm in the presence of bicarbonate/CO₂ causes rapid changes in lipid architecture of the sperm plasma membrane accompanied by membrane destabilization.

Although it may terminate in cell death [14], destabilization of plasma membrane is an essential step in the process of membrane fusion. Loss of membrane asymmetric properties is important evidence of membrane destabilization and in fact in seems to be necessary to the successful accomplishment of membrane-membrane fusion.

Caudal epididymal sperm are equally mature and fertile as ejaculated sperm. However, epididymal sperm have no components from the seminal plasma that may have been absorbed or bound during ejaculation [29]. Under these conditions, a significantly higher percentage of epididymal than of ejaculated sperm are capacitated during the 6 h incubation period. This experimental advantage of cauda epididymal over ejaculated sperm subsists during the induction of the acrosome reaction [12].

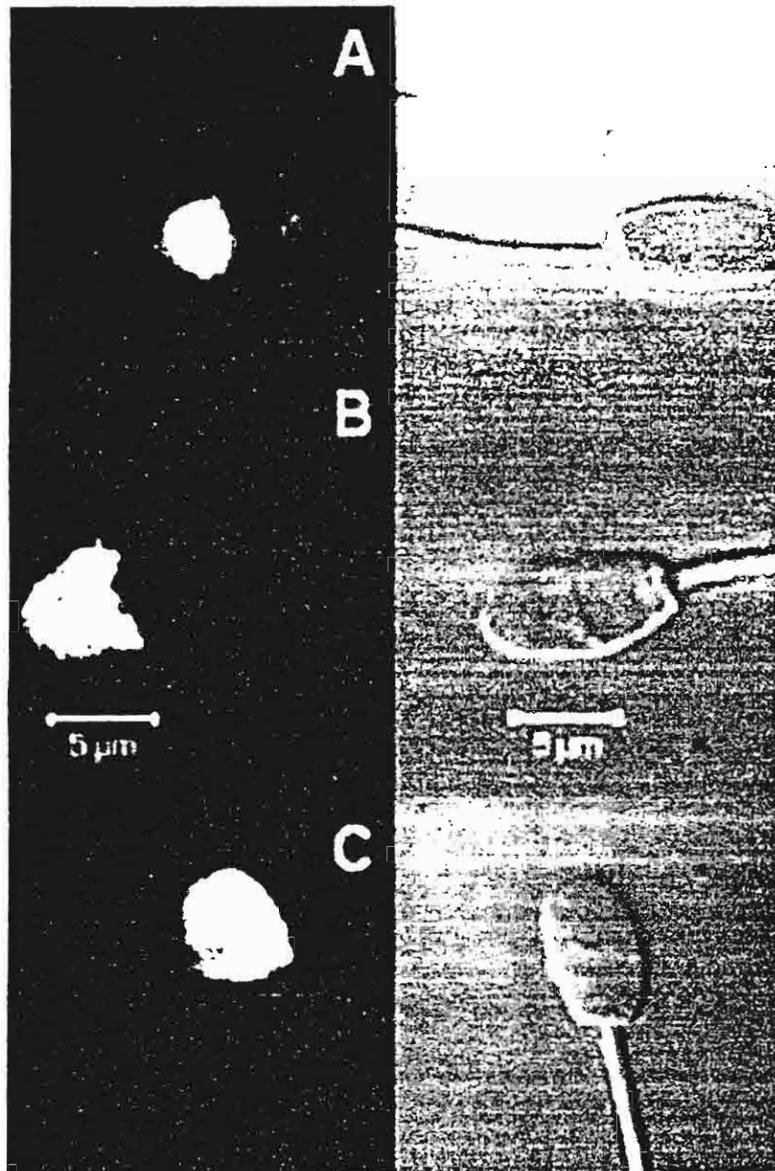
Stimulation of sperm capacitation and induction of the acrosome reaction by progesterone has been demonstrated in various animal species [16]. The induction of specific

230

235

240

Q5



Q5

Figure 4. Three patterns obtained by confocal microscopy of Annexin-stained viable rabbit sperm (only sperm cells with no red fluorescence were included in these studies). a) Capacitated sperm. A small fluorescence increase was observed after 6 h incubation under capacitating conditions basically due to presence of fluorescence in post-acrosomal region of sperm head. b) Sperm incubated 15 minutes in presence of Progesterone. Characteristically showed a bright band of green fluorescence over peri-equatorial region of sperm head. This biphasic character was lost after 45 min incubation. c) Sperm incubated 15 minutes in presence of A23187. Showed a uniform green fluorescence over acrosomal region and a small fluorescence over the post-acrosomal region of sperm head.

binding of Annexin-V FITC to the rabbit sperm acrosome membrane by the presence of progesterone in the medium constitutes an indirect proof of the existence of specific progesterone receptor in rabbit spermatozoa. Any important physiological or pathological alteration of cell plasma membrane may be reflected in phospholipid phosphatidylserine translocation from the inner to the outer leaflet of the plasma membrane. This translocation can be monitored by the calcium-dependent binding of Annexin-V and has been described as one of the earliest signs of apoptosis [18]. However, in the case of the sperm, care must be taken because changes in lipid composition and phosphatidylserine translocation are also part of the changes physiologically produced during capacitation, acrosome reaction, and cell-cell-fusion [8, 10, 28]. As in the result of Gadella and Harrison [11], our experiments do not show evidence that the progesterone or A23187-induced phosphatidylserine exposure to the binding properties of Annexin-V was an apoptotic process. On the contrary, capacitation and acrosome reaction concurrent phospholipid scrambling appears to be important physiological events during sperm fertilization activity.

Binding of significant amounts of Annexin to the post-acrosomal membrane of sperm during capacitation indicates that some modification of this region of the head plasma membrane occurs during this process. This partial destabilization may be important to prepare the sperm to fuse with the oolema after going through the Zone Pellucida, although the binding of Annexin to this region of the sperm head persists after A23187 induction of the acrosome reaction. Progesterone seems to have the opposite effect since the slight post-acrosomal fluorescence decrease. Intense Annexin binding in the limit between the acrosomal and the post-acrosomal region may point to the accumulation of effects on preparation for the sperm-oocyte fusion. The biphasic curve of Annexin binding to sperm membranes disappeared as the time of incubation progressed, indicating perhaps, that the increasing participation of sperm that has already undergone acrosome reaction [10].

Many compounds have been identified as inductors of the acrosome reaction, although the zone proteins of the ovulated oocyte are now considered the prime physiological inducer *in vivo* [5-7, 14, 19, 20, 28]. Although the acrosome reactions is an important step during gamete interruption, it must not be forgotten that after penetration through the Zone Pellucida spermatozoa must fuse with the oocyte membrane. The post-acrosomal plasma membrane has a phospholipids composition quite different to that of the plasma membrane overlying the acrosome [20, 28]. This important sub domain difference suggests that these membrane regions may be differentially responsive to signals so that they may function precisely when needed. The post-acrosomal region of the sperm membrane must also go through a physiological process that will render it able to fuse with the oolema.

In vitro capacitation and/or acrosome reaction induction with progesterone or with A23187 induces important and differential changes in the membrane asymmetry of the acrosomal and post-acrosomal sub domains of the sperm head plasma membrane. It would appear that changes in the phospholipids asymmetry of the equatorial and/or the whole post-acrosomal membrane are indispensable to expose the elements; proteins playing a role in sperm-oocyte membrane fusion are only exposed after the capacitation and/or the acrosome reactions [4]. Allen/Green [1] found that after A23187-induced acrosome reaction of guinea pig sperm, a group of equatorial segment epitopes are exposed that may play some role in the fusion of sperm and oocyte. Equatorin is a sperm head equatorial

protein possibly involved in sperm-oocyte fusion, which is detectable only after spontaneous or induced acrosome reactions [21]. 290

After going through the Zone Pellucida, the sperm comes into contact with the oolemma to be able to successfully complete the successful fusion of the two gametes; a specific set of changes must have occurred in the plasma membranes of both gametes. The nature of these changes on the post-acrosomal membrane of the sperm cells must be studied more accurately 295

REFERENCES

1. Allen CA and Green DPL (1995): Monoclonal antibodies which recognize equatorial segment epitopes presented de novo following the A23187-induced acrosome reaction of guinea pig sperm. *J Cell Sci* 108:767-777. 300
- Q2 2. Alonso-Pozos I, et al. (2003): Mechanism of granulosa cell death during follicular atresia depends on follicular size. *Theriogenology* 60:1071-1081. 301
- Q2 3. Baldi E, et al. (1996): Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: Role of calcium, protein phosphorylation and lipid remodeling pathways. *Frontier in Bioscience* 1:189-205. 305
- Q2 4. Bedford JM (1998): Mammalian fertilization miscad? Sperm penetration of the eutherian zone pellucida is unlikely to be a lytic event. *Biol Reprod* 59:1275-1287.
5. Breitbart H and Spungin B (1997): The biochemistry of the acrosome reaction. *Mol Hum Reprod* 3:195-202.
6. Brucker C and Lipford GB (1995): The human sperm acrosome reaction: physiology and regulatory mechanisms. An update. *Hum Reprod Update* 1:51-62. 310
- Q2 7. de Lamirande E, et al. (1997): Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Mol Hum Reprod* 3:175-194. 312
- Q2 8. de Vries KJ, et al. (2003): Caspase-independent exposure of aminophospholipids and tyrosine phosphorylation in bicarbonate responsive human sperm cells. *Biol Reprod* 68:2122-2134. 315
- Q2 9. Fraser LR, et al. (1995). Ca^{2+} -regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis. *Mol Reprod Dev* 40:233-241. 317
- Q3 10. 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. 320
11. Gadella BM and 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. 321
- Q3 12. Garcia-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. 324
- Q3 13. 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. 326
14. Harrison RA (1996): Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. *Reprod Fertil Dev* 8:581-594. 329
- Q3 15. Harrison RA and Miller NGA (2000): cAMP-dependent protein kinase control of plasma membrane lipid architecture in boar sperm. *Mol Reprod Dev* 55:220-228. 330
- Q3 16. Kirkman-Brown JC, et al. (2002): Zona pellucida and progesterone-induced Ca^{2+} signaling and acrosome reaction in human spermatozoa. *J Androl* 23:306-315. 333

- Q3 17 Köhn FM, et al (1997): Detection of human sperm acrosome reaction: comparison between methods using double staining, *Pisum sativum* agglutinin, concanavalin A and transmission electron microscopy. *Human Reprod* 12:714-721. 335
- Q3 18. Koopman G, et al. (1994): Annexin-V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84:1415-1420. 333
- 19 Kopf GS (2002): Signal transduction mechanisms regulating sperm acrosomal exocytosis. In *Fertilization*. Hardy DM (Ed). San Diego California, USA. Academic Press Inc. pp 181-223. 340
20. Lin Y and Kan FW (1996): Regionalization and redistribution of membrane phospholipids and cholesterol in mouse spermatozoa during in vitro capacitation. *Biol Reprod* 55:1133-1146
21. Manandhar G and Toshimori K (2001): Exposure of sperm head equatorin after acrosome reaction and its fate after fertilization in mice. *Biol Reprod* 65:1425-1436. 345
- 22 Meizel S and Turner KO (1993): Initiation of human sperm acrosome reaction by Thapsigargin. *J Exp Zoo* 267:350-355.
- Q3 23. Miller DJ, et al. (1993): Sperm require β -N-acetyl-glucosaminidase to penetrate through the egg zona pellucida. *Development* 118:1279-1289. 343
- Q3 24. Roldan ER, et al. (1994): Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida. *Science* 266:1578-1581. 350
25. Sokal RR and Rohlf FJ (1981): *Biometry*. In: *The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*. Freeman WH (Ed). New York: USA P P 342
- Q4 26. Suárez SS, et al. (1986): Induction of the acrosome reaction in human spermatozoa by a fraction of human follicular fluid. *Gamete Res* 4:407-432. 341
- Q3 27. Thérien I and Manjunath P (2003): Effect of progesterone on bovine sperm capacitation and acrosome reaction. *Biology of Reproduction* 69:1408-1415. 355
- potential of mammalian spermatozoa. *J Clin Invest* 110:731-736.
- 29 Yanagimachi R (1994): Mammalian fertilization. In: *The Physiology of Reproduction*. Knobil E, Neill JD (Eds). New York: Raven Press, pp 189-315. 360