



Unitat de Biofísica
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Facultat de Medicina
Universitat Autònoma de Barcelona



**PAPER DELS LÍPIDS DE MEMBRANA EN LA CAPACITACIÓ I
REACCIÓ ACROSÒMICA DE L'ESPERMATOZOIDE DE BOC:
ESTUDIS BIOFÍSICS**



MÒNICA COMPANYÓ CASANOVAS

Bellaterra, Abril de 2004



Unitat de Biofísica
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Facultat de Medicina
Universitat Autònoma de Barcelona

**PAPER DELS LÍPIDS DE MEMBRANA EN LA CAPACITACIÓ
I REACCIÓ ACROSÒMICA DE L'ESPERMATOZOIDE DE
BOC:
ESTUDIS BIOFÍSICS**

Memòria presentada per *MÒNICA COMPANYYÓ CASANOVAS*, llicenciada en Ciències Biològiques, per a optar al grau de Doctor en Bioquímica i Biologia Molecular per la Universitat Autònoma de Barcelona

Aquest treball ha estat realitzat a la Unitat de Biofísica del Departament de Bioquímica i de Biologia Molecular, Facultat de Medicina, de la Universitat Autònoma de Barcelona, sota la direcció del Dr. **ANTONI MORROS I CARULLA**

Vist i plau del director de tesi

Dr. Antoni Morros i Carulla

Bellaterra, Abril de 2004

AGRAÏMENTS

En primer lloc voldria donar les gràcies als meus pares, perquè m'han donat sempre la llibertat de prendre les meves pròpies decisions i per haver-me recolzat sempre en tot allò que he emprès. Moltes gràcies papis. També voldria donar les gràcies al nen i a la nena xica, els meus germans, sense els quals, jo no seria tal com sóc ni la meva vida seria la mateixa.

Voldria donar les gràcies a en Toni Morros perquè, quan jo ja havia decidit que no, ell em va saber convèncer (encara no sé com) de venir a l'Autònoma. Vaig fer la Tesina, i quan ja pensava anar-me'n, va sortir una plaça de Profe Associada, gràcies a la qual he pogut fer la Tesi. No sé com m'ha aguantat tots aquests anys, sobretot aquests últims dies ... Tindrà molts defectes, com tothom, però s'ha de reconèixer que és una bellíssima persona. I això ha fet que l'ambient de treball sempre hagi estat molt agradable. A ell li vull agrair tot el què he après, sobretot en la recerca "biofísica" i també pel que fa a temes de docència i pedagogia. Moltes gràcies Toni per la teva paciència i pels teus, sempre, bons consells.

També voldria donar les gràcies a la Pax, per deixar-me col·laborar amb el seu grup. L'altre dia em va confessar que el Toni Morros treballa amb espermatozoides perquè ella el va mig *embaucar* (paraules textuais seves). Llavors li he de donar les gràcies per partida doble. Moltes gràcies Pax, per donar-me sempre ànims i fer-me tocar de peus a terra ...

A en Toni Iborra, estimat company de penes i fatigues, li he d'agrair que m'introduís dins el món de la recerca; no sé com s'ho fa, però sempre sap veure la part positiva dels experiments dolents. A ell vull agrair-li tots

Agraïments

els experiments, discussions, estones, xerrades, xerrameques, acudits, ... compartits. Això també va per la resta de gent d'Immuno, que en algun moment o altre vam compartir el laboratori: el Joanjo, la Pilar, la Neus, la M^a José, l'Eva, la Gizi (que em va ajudar molt mentre jo vaig ser allà amb ella), la Maritza, el Pepe, el Roger, la Susana... (segur que em deixo algú...). El que sí que no oblidaré mai, però, seran les *FONDUES* de l'IBF!!!! Reconec que serà el què més trobaré a faltar... Aquella xocolata negra...ummmmmmm. Aprofito per felicitar als cuiners/eres i donar-los les gràcies per fer-me passar moments tan dolços! (Ah, ja sé que ara és l'IBB, però encara em costa...).

De Biofísica, no sé ni per on començar... ha passat tanta gent... Començaré pels que ja no hi són...

Al Quim, per ajudar-me en la fluorescència; sempre estava a punt per respondre els meus nombrosos dubtes i per ajudar-me quan el fluorímetre es negava a treballar. A part d'això va "inventar-se" un programet amb el qual m'he estalviat un munt de feina. Al primer informàtic de tots, el Juanma perquè mai no va gosar queixar-se de les meves inacabables desavinences amb els ordinadors; el què per mi i per la majoria de mortals és un gran problema informàtic, per a ell es reduïa a un monosíl·lab: ah!. i ja tenia resolt el gran problema. Li vull agrair el programa que va dissenyar i que em va estalviar un munt d'hores davant del fluorímetre. També vull agrair a tots els informàtics que han anat passant per aquesta casa la paciència que han tingut amb mi, sobretot l'últim, que ha patit potser una mica més el meu histerisme, oi Rafa? Moltes gràcies per poder disposar sempre de tu (informàticament...). Al Paco, per ensenyar-me a escriure a

Agraïments

l'ordinador quan vaig fer el meu primer treball de tercer cicle (fins llavors no n'havia tocat mai cap!!!), sense que això li afectés el seu bon humor que el caracteritza. A la Tzvetana (per mi, afectuosament Tzveta, encara que no li agradava massa), per preocupar-se sempre de tothom i de mi; era com la nostra (meva) mare al lab. Al Samir, perquè amb ell podia practicar francès (no sigueu mal pensats...). A tots els de la meva quinta (i no tant de la meva quinta) que ja se'n van anar, el Jordi, la Pilar, el "meu" Dani (que vam començar plegats i que per sort, ara ha tornat a la recerca), l'Anako, l'Emma (medalla d'or en els jocs olímpics per a bombers!!! Jo, de gran, vull ser com ella...) la Carol, la Susana i el Jose, la Mierce i els pocs que queden, la Natàlia i el Víctor A., per compartir bons moments al lab. i al bar de la facultat!. Quan el Víctor guanyi el Nobel, jo podré dir que vaig treballar amb ell. A part de tenir un gran cervell, també té un gran cor. A l'Ana Andrés, perquè a part de compartir el dia de lectura de la tesina, ara compartim amics comuns. A l'Àfrica, al Ramon i a l'Àlex per haver-me suportat durant les classes d'"Orgasme" i per haver-me ajudat sempre en tot. Tots tres magnífiques persones. A l'Àfrica no calia demanar-li mai ajuda, te la brindava inclús abans de que tu sabessis que la necessitaves. El Ramon, encara que sempre està enfeinat, tampoc ha deixat mai d'ajudar-me. Al contrari, recordo que encara li dec un Sant Jordi; va deixar d'anar a les Rambles per venir a fer unes fotos que la meva família necessitava. I com no, ell és l'autor de la foto que veureu més endavant. Després del Rafa, l'Àlex és l'informàtic de la Unitat. Quan era profe ja es va encarregar dels ordinadors de pràctiques, i a la Unitat no s'ha queixat mai (almenys al meu davant ...) de totes les molèsties que li he causat per culpa de la meva incompetència amb els ordinadors. A la Laura, per tota la seva simpatia i bon

Agraïments

humor. Al Pep, per compartir despatx (almenys fins el dia d'entrega de la Tesi... et prometo que després el deixo lliure!!!), i perquè en els meus inicis em va ensenyar a fer anar el famós Sigma Plot (potser ell ja ni ho recorda, fa tant d'això...), i perquè, ara, no para de corregir-me els meus escrits en anglès (per alguna cosa havia de servir anar-se'n fora...) però sobretot per fer-me companyia a l'hora del cafè. A l'Antonio (Frumento), per compartir també, durant un temps el despatx, però sobretot per totes les xerrades científiques i no tan científiques que m'ha dedicat. A la meua companya de grup, l'Hanna per aguantar-me i per deixar-me compartir el Toni. A tots els companys de lab, l'Imma, el Julio, el Víctor B., el Xavi i a tots els nous fitxatges, la Marta, la Guiomar, el David (provenint de bona zona), l'Alba, l'Anna i la Rosana, per compartir bones estones. A les gestores departamentals, la Isabel i la Clara (sé que no els agradava això de gestora departamental...), perquè sempre em van donar ànims i bons consells. A la Mercè secre per deixar-me treballar en el seu ordinador i per deixar-me engegar l'aire condicionat. A tots els tècnics que han passat, especialment els Danis, pel seu bon "rotllo" i l'Elo perquè amb ella, la Mercè i la Clara em fan de mares. A tots els "jefes", el Manel (l'exVicerector), el Joan, l'Esteve, el Pere, la Mireia i el David, pel seu bon acolliment i pel bon humor que sempre han mostrat. A tots, moltes gràcies per fer-me sentir tan bé a la feina, de veritat.

Voldria agrair a la Maite Paramio, del Departament de Producció Animal, de Veterinària, la seva amabilitat pel que fa a la disposició dels boccs, i a totes les persones del seu grup que em van ajudar sempre en la recollida de les mostres: la Dolors, la Patricia, la Maria, l'Ester, i especialment l'Elisabet, amb qui he compartit bona part de la tesi i també

Agraïments

moltes Animalades; no oblidaré mai les passejades amb la microgota, les corregudes darrera del maleït boc, l'investida del marrà, el perfum que no abandona ...

A tots els meus companys de carrera, pels anys i patiments compartits: l'Àlex, la Lídia i el Bruno, la Susu i el Xavi, l'Anna i el Migui, el Manolo i la Yolanda, i especialment la Tere i el Danielle per encoratjar-me sempre en els moments difícils i fer-me veure les coses tal com són. Moltes gràcies Tere, perquè, inclús des de la llunyania, sempre has estat a prop meu.

Al Martín i la Ita, que vam començar sent companys d'anglès, i ara són amics dels que es troben a faltar quan no es veuen. Moltes gràcies per animar-me, per estar amb mi els dimecres a la nit, i tots els altres dies, encara que sigui per telèfon o en el pensament. I a l'Eduard, pels seus consells informàtics. I a la família McPedraza, per animar-me sempre. A totes les Taques Negres i a totes les meves companyes del bàsquet, per entendre'm quan he faltat aquests últims dies, i per animar-me (Som-hi!).

A "la mujer 10", la Carmeta, per convidar-me a casa seva i per fer-me el sopar, planxar-me la roba, fer-me infusions, fer-me el cafè al matí, ... Vaja, per fer-me de mare quan vivia amb ella. A la Ghizlane i la Lamy, les meves primeres companyes de pis a Cerdanyola, i a la Karima i a la Mireia, les següents, per ensenyar-me que l'amistat no té fronteres, ni colors, ni religions. Les vaig conèixer per una casualitat (gràcies a l'Àfrica, i l'Àfrica gràcies a la Tere) i ara formen part de la meva colla d'amics. A la Ghiz, amb qui porto gairebé cinc anys vivint, li vull agrair els couscous, els tes a la menta, les harires, el rentar-me la roba, el fer-me el menjar quan jo no

Agraïments

tenia temps, en fi, l'amistat que m'ha regalat. Moltes gràcies a totes, i a tots els amics que a través d'elles he conegut.

Finalment voldria donar les gràcies a una persona molt especial, el Daniel. Gràcies per patir amb mi aquests últims dies. Gràcies per donar-me sempre suport. Gràcies per estar al meu costat quan et necessito. Gràcies per estimar-me.



Finalment, voldria agrair, la donació "voluntària" (o no) de les mostres; sense ell aquest treball no hauria estat possible!

Malauradament, aquest apartat, potser el més important (perquè sense tots vosaltres aquest treball no hauria estat possible), sempre es fa de pressa i corrents i sempre es queda algú fora. Només espero, que si t'he deixat de mencionar m'ho sàpigues perdonar...

MOLTES GRÀCIES A TOTS!!!

ÍNDEX

1 INTRODUCCIÓ	1
1.1 Introducció general	2
1.2 Formació dels espermatozoides: espermatogènesi ...	3
1.3 Maduració dels espermatozoides	6
1.4 El plasma seminal	8
1.5 Característiques morfològiques de l'espermatozoide madur	9
1.6 Composició lipídica de la membrana plasmàtica.....	11
1.7 Capacitació.....	12
1.7.1 Eliminació del plasma seminal.....	14
1.7.2 Organització de la membrana plasmàtica.....	14
1.7.3 Sortida de colesterol	17
1.7.4 Acceptors de colesterol	18
1.7.5 Fluïdesa de membrana	20
1.8 La reacció acrosòmica.....	28
1.9 La capacitació <i>in vitro</i>	31
2 OBJECTIUS	33
3 MATERIALS I MÈTODES	36
3.1 Materials.....	37
3.1.1 Reactius.....	37

3.1.2 Instruments utilitzats	38
3.2 Mètodes preparatius i analítics	40
3.2.1 Obtenció de la mostra	40
3.2.2 Eliminació del plasma seminal.....	41
3.2.3 Modificació del contingut de colesterol dels espermatozoides i distribució de la mostra en alíquotes per als diferents estudis	42
3.2.3.1 Alíquota per a la determinació de la reacció acrosòmica i de la vitalitat	43
3.2.3.2 Alíquota per a les anàlisis lipídiques i preparació de liposomes.....	44
3.2.3.3 Alíquota per als estudis d'anisotropia de fluorescència.....	44
3.2.3.4 Alíquota per als estudis de microscòpia confocal	44
3.2.3.5 Alíquota per als estudis de citometria de flux.....	45
3.2.4 Valoració de la reacció acrosòmica i de la vitalitat dels espermatozoides	45
3.2.4.1 Patrons de marcatge de la triple tinció	46
3.2.5 Extracció lipídica	47
3.2.6 Determinació de colesterol	48
3.2.6.1 Fonament del mètode	49
3.2.6.2 Composició dels reactius en el kit original.....	49
3.2.6.3 Composició dels reactius modificats	50
3.2.6.4 Descripció del mètode	50
3.2.7 Determinació de fosfolípids	51
3.2.7.1 Composició del reactiu.....	51
3.2.7.2 Fonament del mètode.....	51

3.2.7.3	Descripció del mètode	52
3.2.8	Preparació dels liposomes per als estudis de fluorescència.....	53
3.2.9	Preparació dels espermatozoides per als estudis de fluorescència.....	54
3.2.10	Preparació dels espermatozoides per als estudis en el microscopi confocal.....	54
3.2.11	Preparació dels espermatozoides per als estudis de citometria de flux.....	55
3.3	Mètodes espectroscòpics	55
3.3.1	Anisotropia de fluorescència	55
3.3.1.1	Fonaments teòrics de la tècnica.....	55
3.3.1.2	El fluoròfor.....	62
3.3.1.3	Microviscositat aparent.....	64
3.3.1.4	Descripció de l'aparell	66
3.3.1.5	Marcatge de la mostra amb la sonda fluorescent (DPH).....	67
3.3.1.6	Adquisició de les dades.....	68
3.3.1.6.a	Espectres d'excitació.....	69
3.3.1.6.b	Espectres d'emissió.....	69
3.3.1.6.c	Anisotropia	69
3.3.1.7	Corbes de transició de fase.....	70
3.4	Marcatge selectiu de dominis lipídics de les membranes de l'espermatozoide. Microscòpia confocal.	71
3.4.1	Fonaments teòrics de la tècnica	71
3.4.1.1	Marcatge amb merocianina 540 (MC 540).....	72

3.4.1.1.a Control de la viabilitat dels espermatozoides marcats amb MC 540.....	74
3.4.1.1.b Preparació de les mostres per a la microscòpia confocal	75
3.4.1.1.c Visualització de la fluorescència de la MC 540	75
3.4.1.1.d Tractament dels resultats.....	76
3.5 Distribució poblacional de la fluïdesa de membrana: estudis per citometria de flux	77
3.5.1 Fonaments teòrics de la tècnica	77
3.5.1.1 Preparació de les mostres per a la citometria de flux	81
3.6 Anàlisis estadístiques	83
3.6.1 Anàlisi estadística del contingut de colesterol i del percentatge de reacció acrosòmica	83
3.6.2 Anàlisi estadística dels resultats d'anisotropia de fluorescència.....	83
3.6.3 Anàlisi estadística dels resultats obtinguts per microscòpia confocal	84
3.6.4 Anàlisi estadística dels resultats obtinguts per citometria de flux.....	84
4 RESULTATS	85
4.1 Conseqüències de l'eliminació de colesterol de les membranes dels espermatozoides	86
4.1.1 Contingut de colesterol i de fosfolípids en els espermatozoides intactes.....	86

4.1.2 Efecte de la BSA	86
4.1.2.1 Contingut de colesterol i percentatge de reacció acrosòmica (RA) en espermatozoides tractats amb BSA....	87
4.1.3 Efecte de la de β-ciclodextrina	88
4.1.3.1 Contingut de colesterol i percentatge de reacció acrosòmica en espermatozoides tractats amb diferents concentracions de β CD	90
4.1.3.2 Contingut de colesterol en el medi de capacitació d'espermatozoides tractats amb β -ciclodextrina.....	93
4.1.3.3 Vitalitat dels espermatozoides tractats amb diferents concentracions de β -ciclodextrina	94
4.1.3.4 Efecte del temps d'incubació en β -ciclodextrina sobre el contingut en colesterol i sobre el percentatge de reacció acrosòmica.....	95
4.1.3.5 Contingut de fosfolípid en espermatozoides tractats amb β -ciclodextrina	97
4.1.4 Efecte de l'heparina	98
4.1.4.1 Contingut de colesterol i percentatge de reacció acrosòmica en espermatozoides tractats amb heparina.....	98
4.1.5 Efecte de la progesterona	99
4.1.5.1 Percentatge de RA en espermatozoides tractats amb progesterona.....	100
4.1.5.2 Vitalitat dels espermatozoides tractats amb progesterona.....	101
4.2 Estudis biofísics de les membranes d'espermatozoides mitjançant anisotropia de fluorescència	102

4.2.1 Optimització de la tècnica d'anisotropia de fluorescència	102
4.2.1.1 Espectres d'excitació i d'emissió del DPH	103
4.2.1.2 Espectres d'emissió control	107
4.2.1.3 Espectres d'absorció UV control	107
4.2.1.4 Optimització dels filtres	108
4.2.1.5 Cinètica d'incorporació del DPH	110
4.2.1.6 Vitalitat dels espermatozoides marcats amb DPH..	112
4.2.2 Comportament termotròpic de les membranes dels espermatozoides, mitjançant anisotropia de fluorescència ..	113
4.2.2.1 Comportament termotròpic d'un lípid conegut, DPPC (controls preliminars)	114
4.2.2.2 Comportament termotròpic de liposomes provinents d'extractes lipídics d'espermatozoide	116
4.2.2.3 Comportament termotròpic d'espermatozoides sencers	119
4.3 Detecció de dominis lipídics per microscòpia confocal	124
4.4 Distribució poblacional de la fluïdesa de membrana: estudis per citometria de flux	132
5 DISCUSSIÓ	139
5.1 Inducció de reacció acrosòmica per l'eliminació de colesterol de les membranes dels espermatozoides....	140
5.1.1 Contingut de colesterol i de fosfolípids en espermatozoides intactes	141
5.1.2 Efecte de la BSA	141

5.1.3 Efecte de la β CD.....	143
5.1.4 Efecte de l'heparina	146
5.1.5 Efecte de la progesterona	147
5.1.6 Models explicatius dels diferents mecanismes d'eliminació del colesterol de les membranes.....	148
5.2 Estudis biofísics de les membranes dels espermatozoides mitjançant anisotropia de fluorescència	151
5.2.1 Comportament termotròpic de liposomes provinents d'extractes lipídics de d'espermatozoide	151
5.2.2 Comportament termotròpic d'espermatozoides sencers	153
5.2.2.1 Espermatozoides control.....	153
5.2.2.2 Espermatozoides tractats amb β CD	158
5.3 Discussió sobre les conseqüències biològiques de la sortida de colesterol.....	160
5.4 Detecció de dominis lipídics	162
5.4.1 Discussió sobre l'ús de merocianina 540.....	162
5.4.2 Discussió dels resultats obtinguts per microscòpia confocal	164
5.4.2.1 Discussió sobre les imatges obtingudes per a espermatozoides control.....	164
5.4.2.2 Discussió sobre les imatges obtingudes per a espermatozoides tractats amb β CD.....	166
5.4.2.2.a Increment de la fluïdesa en l'acrosoma	166
5.4.2.2.b Canvis de fluïdesa en la regió apical	167
5.4.2.2.c Canvis de fluïdesa en la regió equatorial	167

Índex

5.4.2.2.d Manteniment de la rigidesa de la regió postacrosomal.....	168
5.4.2.2.e Increment de la fluïdesa en la peça intermèdia	169
5.4.2.2.f Patró D.....	169
5.5 Discussió dels resultats obtinguts per citometria de flux	170
6 CONCLUSIONS	173
7 BIBLIOGRAFIA.....	177
8 ANNEX.....	203
8.1 Tampons i medis d'incubació	204
8.1.1 Composició dels medis.....	204
8.1.2 Composició del tampó TBS.....	206

ÍNDIX DE FIGURES

Figura 1 Espermatogènesi: formació dels espermatozoides en els testicles (Gilbert 2000).	3
Figura 2 Espermiogènesi, durant la qual es pot observar la progressiva condensació del nucli, la formació del flagel i de l'acrosoma, i la reducció del citoplasma.	5
Figura 3 Representació esquemàtica d'un espermatozoide de mamífer (Flesch i Gadella 2000). A) Representació superficial i B) representació transversal. 1: membrana plasmàtica; 2: membrana acrosomal externa; 3: contingut acrosomal; 4: membrana acrosomal interna; 5: membrana nuclear; 6: nucli; 7: anell posterior o nuclear; 8: peça intermèdia; 9: mitocòndries; 10: anell flagel·lar; 11: flagel.....	10
Figura 4 Les diferents configuracions d'una cadena hidrocarbonada d'àcid gras dels fosfolípids (Shechter 1990).....	20
Figura 5 Esquema dels diferents moviments dels lípids que poden tenir lloc dins d'una membrana: rotació, difusió lateral, moviment de balanceig de les cadenes hidrocarbonades o flexió i difusió transversal o <i>flip-flop</i> (Alberts i col. 1994).	21
Figura 6 Les diferents conformacions de les cadenes hidrocarbonades dels lípids dins d'una bicapa (Mantsch i col. 1981).....	23
Figura 7 Representació esquemàtica de la molècula de colesterol (Stryer 1988).....	26
Figura 8 Dibuix esquemàtic de l'orientació de la molècula de colesterol entre els fosfolípids en una bicapa lipídica (Houslay i Stanley 1990)	26
Figura 9 Efecte del colesterol en l'anisotropia de fluorescència enfront a la temperatura en vesícules de DPPC (Bhattacharya i Haldar 2000).....	27
Figura 10 Representació esquemàtica d'un espermatozoide de mamífer (Flesch i Gadella 2000). A) Representació superficial, B) representació transversal, C) durant la reacció acrosòmica i D) després de la reacció acrosòmica. 1: membrana plasmàtica; 2: membrana acrosomal externa; 3: contingut acrosomal; 4: membrana acrosomal interna; 5: membrana nuclear; 6: nucli; 7: anell posterior o nuclear; 8: peça intermèdia; 9: mitocòndries; 10: anell anular; 11: flagel; 12: vesiculació (RA); 13: secreció acrosomal; 14: estructura en forma de <i>hairpin</i>	29
Figura 11 Diferents vies de relaxació d'una molècula excitada electrònicament per l'absorció de radiació electromagnètica. Les fletxes ondulades representen processos en els quals l'energia és perduda sense l'emissió de fotons; les fletxes en línia recta representen tant l'absorció com l'emissió de fotons.....	56
Figura 12 Diagrama esquemàtic d'un espectrofluorímetre en disposició T (Lakowicz 1983).	59

Índex

Figura 13 Moviment rotacional d'una sonda fluorescent incorporada dins d'una bicapa lipídica (Slavik 1994).	61
Figura 14 Comparació del moviment rotacional de la sonda DPH amb el del fosfolípids (Hilderson 1988).	62
Figura 15 La sonda fluorescent representa un corresposal molecular en la mostra biològica (Slavik 1994).	62
Figura 16 Estructura molecular del DPH (Shechter 1990).	64
Figura 17 Localització del DPH en la bicapa lipídica.	64
Figura 18 Esquema del funcionament d'un microscopi òptic confocal.	71
Figura 19 Estructura de la sonda MC 540 (Sieber 1987).	74
Figura 20 Estructura del Yo-Pro-1.	74
Figura 21 Sistema de fluids en un citòmetre de flux.	79
Figura 22 Esquema del sistema òptic en un citòmetre de flux.	79
Figura 23 Tipus de dispersió de la llum, en funció de les propietats físiques de les cèl·lules.	80
Figura 24 Percentatge de colesterol no esterificat en espermatozoides tractats amb diferents concentracions de BSA durant 120 minuts. Els valors expressats són mitjanes \pm SEM (n = 4).	87
Figura 25 Estructura de la β -ciclodextrina.	90
Figura 26 Percentatge de colesterol no esterificat contingut en espermatozoides tractats amb diferents concentracions de β CD durant 150 minuts. Els valors expressats són mitjanes \pm SEM (n = 4).	91
Figura 27 Percentatge de reacció acrosòmica fisiològica d'espermatozoides tractats amb diferents concentracions de β CD durant 150 minuts. Els valors expressats són mitjanes \pm SEM (n = 2).	92
Figura 28 Vitalitat dels espermatozoides tractats amb diferents concentracions de β CD durant 150 minuts. Els valors expressats són mitjanes \pm SEM (n = 5).	94
Figura 29 Cinètica de la sortida de colesterol no esterificat de les membranes dels espermatozoides per β CD 8 mM (rodones negres) en comparació amb la dels controls (rodones blanques). Els valors expressats són mitjanes \pm SEM (n = 4).	95
Figura 30 Cinètica de la RA obtinguda en espermatozoides tractats amb β CD 8 mM (rodones negres) en comparació amb la dels control (rodones blanques). Els valors expressats són mitjanes \pm SEM (n = 3).	96

Índex

- Figura 31** Contingut de fosfolípid en espermatozoides control (rodones negres) i en espermatozoides tractats amb β CD 8 mM (rodones blanques) a diferents temps. Valors expressats com a mitjanes \pm SEM (n = 3).....97
- Figura 32** Efecte de la presència d'heparina en el contingut de colesterol (barres blanques) i en la RA (barres grises) d'espermatozoides de boc incubats amb diferents medis durant 150 min.....99
- Figura 33** Increment de la reacció acrosòmica (RA) en espermatozoides de boc incubats durant 2h en presència de progesterona, i prèviament tractats amb β CD 8 mM durant 5 min.....101
- Figura 34** Vitalitat dels espermatozoides tractats amb β CD i progesterona.....101
- Figura 35** Espectres d'excitació i d'emissió del DPH en una mostra de liposomes de DPPC (0.3 mg/ml) en tampó TBS a 20°C. Cada espectre és adquirit amb una combinació dels polaritzadors d'excitació i d'emissió diferent: — I_{wv} , --- I_{vh} , --- I_{hv} , I_{hh} . Sense filtres i amb les esclatxes: 2, 4, 8 i 8. 104
- Figura 36** Espectres d'excitació i d'emissió del DPH en una mostra de liposomes provinents d'extractes lipídics d'espermatozoides control (600×10^6 cèl·lules/1.7 ml) en tampó TBS a 37°C. Cada espectre és adquirit amb una combinació dels polaritzadors d'excitació i d'emissió diferent: — I_{wv} , --- I_{vh} , --- I_{hv} , I_{hh} . Sense filtres i amb les esclatxes: 2, 4, 8 i 8..... 104
- Figura 37** Espectres d'excitació i d'emissió del DPH en una mostra d'espermatozoides control (50×10^6 cèl·lules/1.7 ml) en medi M-199 sense vermell de fenol a 37°C. Cada espectre és adquirit amb una combinació dels polaritzadors d'excitació i d'emissió diferent: — I_{wv} , --- I_{vh} , --- I_{hv} , I_{hh} . Sense filtres i amb les esclatxes: 2, 4, 8 i 8..... 105
- Figura 38** Espectres d'excitació i d'emissió del DPH en una mostra de liposomes de DPPC (0.3 mg/ml) en tampó TBS a 20°C. Cada espectre és adquirit amb una combinació dels polaritzadors d'excitació i d'emissió diferent: — I_{wv} , --- I_{vh} , --- I_{hv} , I_{hh} . Amb filtres (2B) i amb les esclatxes: 2, 4, 0 i 0..... 105
- Figura 39** Espectres d'excitació i d'emissió del DPH en una mostra de liposomes provinents d'extractes lipídics d'espermatozoides control (600×10^6 cèl·lules/1.7 ml) en tampó TBS a 37°C. Cada espectre és adquirit amb una combinació dels polaritzadors d'excitació i d'emissió diferent: — I_{wv} , --- I_{vh} , --- I_{hv} , I_{hh} . Amb filtres (2B) i amb les esclatxes: 2, 4, 0 i 0..... 106
- Figura 40** Espectres d'excitació i d'emissió del DPH en una mostra d'espermatozoides control (50×10^6 cèl·lules/1.7 ml) en medi M-199 sense vermell de fenol a 37°C. Cada espectre és adquirit amb una combinació dels polaritzadors d'excitació i d'emissió diferent: — I_{wv} , --- I_{vh} , --- I_{hv} , I_{hh} . Amb filtres (2B) i amb les esclatxes: 2, 4, 0 i 0..... 106
- Figura 41** Cinètica d'incorporació del DPH en liposomes de DPPC 0.3 mg/ml en TBS a 55°C. • I_{wv} , ◦ I_{vh} , ◻ I_{hv} , ◼ I_{hh} 111

Índex

Figura 42 Cinètica d'incorporació del DPH en liposomes de lípids extrets d'espermatozoides a partir de 300×10^6 cèl·lules/ml en TBS a 37°C . • I_{VV} , ◦ I_{VH} , ◻ I_{HV} , ▪ I_{HH}	112
Figura 43 Cinètica d'incorporació del DPH en espermatozoides 50×10^6 cèl·lules/ml en TBS a 37°C . • I_{VV} , ◦ I_{VH} , ◻ I_{HV} , ▪ I_{HH}	112
Figura 44 Corba d'anisotropia de fluorescència d'un lípid conegut, la DPPC (punts) amb el corresponent ajust teòric (línia contínua).....	115
Figura 45 Corbes d'anisotropia de fluorescència enfront de la temperatura, de liposomes provinents d'extractes lipídics d'espermatozoides control (rodones negres) i d'espermatozoides tractats amb βCD 8 mM durant 1 h (rodones blanques) amb els corresponents ajustos teòrics (línies contínues). Per a cada corba es van obtenir 100 punts experimentals.....	117
Figura 46 Corbes teòriques obtingudes a partir dels ajustos de diferents mostres control ($n = 7$) (corba superior) i tractades amb βCD ($n = 9$) (corba inferior). Les barres d'error dibuixades representen l'error estàndard de les mitjanes (SEM) dels paràmetres r_1 , r_2 i T_m per a les mostres control i tractades (en negreta).....	117
Figura 47 Corbes d'anisotropia de fluorescència (punts) d'espermatozoides control (A) i d'espermatozoides tractats amb βCD 8 mM durant 1 h (B) amb el corresponent ajust teòric (línies contínues). Per a cada corba es van obtenir 100 punts experimentals.....	121
Figura 48 Corbes teòriques obtingudes a partir dels ajustos de diferents mostres control ($n = 6$) (A) i tractades ($n = 6$) (B). Les barres d'error dibuixades representen l'error estàndard de les mitjanes (SEM) dels paràmetres r_1 , r_2 , r_3 , T_{m1} i T_{m2}	122
Figura 49 Exemple d'imatge obtinguda per microscòpia confocal.....	125
Figura 50 Exemple clarificador de com s'obtenien les intensitats mitjanes de fluorescència de la MC 40 de cada zona de l'espermatozoide.	126
Figura 51 Patrons de marcatge d'espermatozoides de boc amb MC 540.....	128
Figura 52 Intensitat mitjana de fluorescència de cada zona dels espermatozoides per a cada patró. Cadascun dels patrons presenta diferències significatives ($p < 0.05$) amb els altres patrons, almenys en alguna de les seves zones.....	129
Figura 53 Freqüències per a cada patró de marcatge amb MC 540 (* $p < 0.05$).....	130
Figura 54 Intensitats relatives de fluorescència de cada regió de l'espermatozoide per a cada patró (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$).....	131
Figura 55 Representacions gràfiques de la grandària enfront de la rugositat, per a diferents tipus cel·lulars (a: mostra de sang, b: línia cel·lular epitelial d'endometri i c: espermatozoides humans) obtingudes per citometria de flux.....	133
Figura 56 Comparació de la simetria en diferents formes de cèl·lules.....	134

Índex

- Figura 57** Representació gràfica de la rugositat (SSC) *versus* la grandària de les cèl·lules (FSC) d'espermatozoides de boc. 134
- Figura 58** Representació gràfica de la fluorescència del Yo-Pro-1 (FL1) *versus* la grandària (FSC) dels espermatozoides de boc. 135
- Figura 59** Representació gràfica de la fluorescència del Yo-Pro-1 (FL1) *versus* la fluorescència de la MC 540 (FL2) per a espermatozoides control (a) i tractats amb β CD 8 mM durant 1h (b). 136
- Figura 60** Exemple de corbes de distribució de la fluorescència de la MC 540 (FL2) en la població d'espermatozoides (*counts*) control (a) i tractats amb β CD 8 mM durant 1h (b). 138
- Figura 61** Quocient d'intensitats mitjanes relatives de la fluorescència de la MC 540 en espermatozoides tractats amb β CD 8 mM , a diferents temps d'incubació, respecte d'espermatozoides control. Existeixen diferències significatives ($p < 0.05$) entre 1h (n = 14), 2h (n = 3), 3h (n = 3) i 0h i també entre 1h i 2h. 138
- Figura 62** Model hipotètic de la sortida de colesterol en la capacitació d'espermatozoides humans (Martínez i Morros 1996). 150
- Figura 63** Model hipotètic del mecanisme de sortida del colesterol de les membranes dels espermatozoides, induït per β CD. 151

ÍNDIX DE TAULES

Taula 1 Esquema de la distribució de la mostra per als diferents estudis.....	42
Taula 2 Patrons de marcatge de la triple tinció (Talbot i Chacon 1981).	46
Taula 3 Percentatge de contaminació per colesterol de diferents albúmines.....	88
Taula 4 Vitalitat dels espermatozoides marcats amb DPH.....	113
Taula 5 Valors dels paràmetres (mitjanes \pm SEM) obtinguts a partir dels ajustos a les dades experimentals.....	118
Taula 6 Valors dels paràmetres (mitjanes \pm SEM) obtinguts a partir dels ajustos a les dades experimentals.....	123
Taula 7 Vitalitat dels espermatozoides marcats amb MC 540.....	132

LLISTAT D'ABREVIATURES I SÍMBOLS UTILITZATS

β CD	Beta-ciclodextrina
λ	Longitud d'ona
Abs	Absorbància
BSA	Albúmina sèrica bovina
Col	Colesterol
DAG	Diacilglicerol
DCFS	Diclorofenolsulfonat
DMSO	Dimetilsulfòxid
DOPC	Dioleilfosfatidilcolina
DPH	1,6-difenil 1,3,5-hexatriè
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
DPPE	Dipalmitoilfosfatidiletanolamina
DSC	Calorimetria diferencial d'escombratge
EPC	Fosfatidilcolina d'ou
FSC	<i>Forward-scattered light</i>
FTIR	Espectroscòpia d'infraroig amb transformada de Fourier
HDL	Lipoproteïnes d'alta densitat
HSA	Albúmina sèrica humana
$I_{VV}, I_{VH}, I_{HV}, I_{HH}$	Intensitat de fluorescència segons la posició dels polaritzadors: H = Horitzontal, V = Vertical
L_{α}	Organització lamel.lar en fase cristall-líquid
L_{β}	Organització lamel.lar en fase gel
LC	Lisofosfatidilcolina
LDL	Lipoproteïna de baixa densitat
M-199	Medi d'incubació <i>Hanks Solution</i>
MC 540	Merocianina 540
MAE	Membrana acrosomal externa
MAI	Membrana acrosomal interna
MLVs	Liposomes multilamel.lars
MP	Membrana plasmàtica
n	Mida de la mostra
p	Nivell de significació del test
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
PLA ₂	Fosfolipasa A ₂
PLs	Fosfolípids

Llistat d'abreviatures

R	Coeficient de determinació
r	Anisotropia de fluorescència
RA	Reacció acrosòmica
SEM	Error estàndard de la mitja
SSC	<i>Side-scattered light</i>
sp	Espermatozoides
T	Temperatura
t	Temps
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
THF	Tetrahidrofurà
T _m	Temperatura de transició de fase
<i>Triton X-100</i>	t-Octifenoxipoli-etoxietanol
VLDL	Lipoproteïna de molt baixa densitat

1 INTRODUCCIÓ

1.1 Introducció general

El primer esdeveniment en la vida és la trobada de l'espermatozoide amb l'oòcit. Una gran quantitat d'espermatozoides són depositats en el tracte genital femení, però només un fertilitzarà l'oòcit. L'espermatozoide madura dins del tracte genital masculí i durant l'ejaculació és depositat dins del tracte genital femení, on experimentarà una sèrie de canvis que el faran capaç de poder fecundar l'oòcit. Quan l'espermatozoide entre en contacte amb l'oòcit el contingut de l'acrosoma, vesícula que es localitza a l'extrem del cap de l'espermatozoide, és alliberat. Els enzims acrosomals alliberats són essencials per a la penetració de l'espermatozoide a la zona pel·lúcida, coberta externa de l'oòcit. La fusió de l'espermatozoide amb l'oòcit porta a la recombinació de la informació genètica procedent del pare i de la mare donant lloc a un nou individu. Aquest procés d'interacció de l'espermatozoide amb l'oòcit és un procés altament regulat. En aquest procés hi té un paper molt important la membrana plasmàtica. Així doncs, la membrana plasmàtica no és només el límit de l'espermatozoide, sinó que és una estructura que intervé dinàmicament en el procés de fertilització i que per tant mereix un estudi acurat.

1.2 Formació dels espermatozoides: espermatogènesi

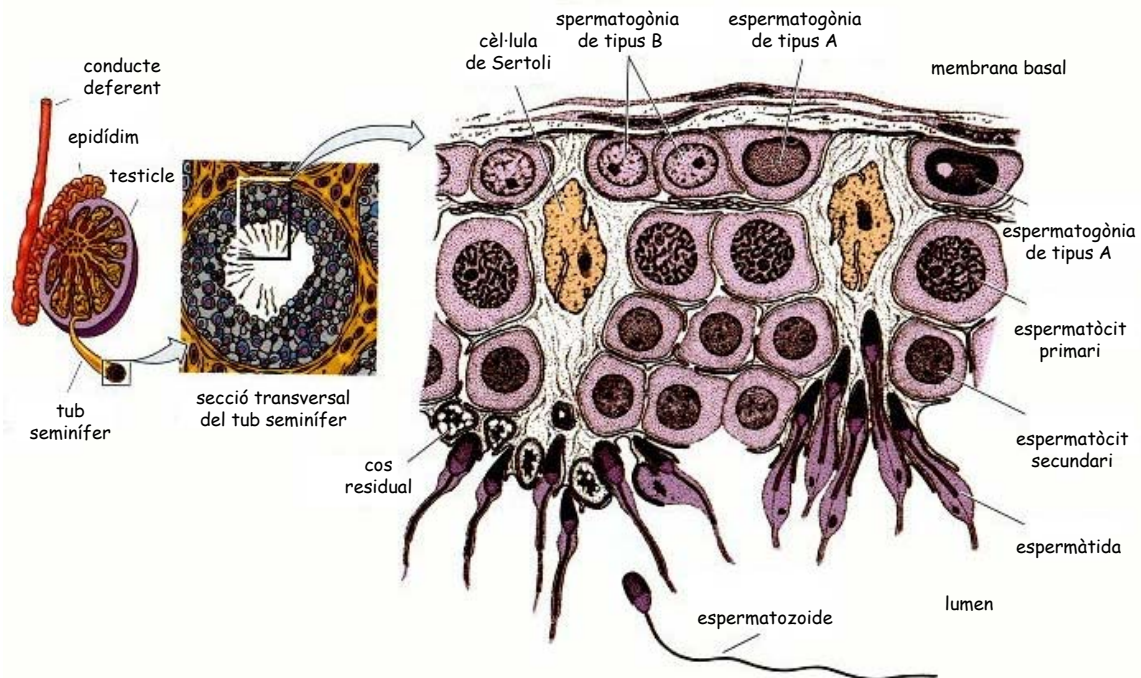


Figura 1 Espermatogènesi: formació dels espermatozoides en els testicles (Gilbert 2000).

Durant la formació dels espermatozoides en els testicles, fenomen anomenat espermatogènesi (vegeu Figura 1), la membrana plasmàtica i altres estructures específiques es preparen perquè en el tracte genital femení i en presència de l'òcit, puguin reaccionar adequadament. L'espermatogènesi en els mamífers comença a la pubertat i consisteix en tres fases seqüenciades de proliferació cel·lular i de diferenciació: l'espermatocitogènesi, la meiosi i l'espermiogènesi.

- En l'**espermatocitogènesi** té lloc la multiplicació i renovació per mitosi de les cèl·lules germinals primordials, les espermatogònies. Les espermatogònies es divideixen en espermatogònies de tipus A i de

tipus B. Les de tipus A són les que proliferen activament per tal de produir-ne més i mantenir així un reservori. Les de tipus B són espermatogònies diferenciades que acabaran donant lloc (per meiosi) a cèl·lules encara més especialitzades, els espermatòcits i, finalment, les espermatides. Aquestes espermatogònies de tipus B ja no podran tornar a donar lloc a les cèl·lules soques o espermatogònies de tipus A. Durant les divisions les cèl·lules van migrant cap al lumen.

- En la **meiosi** es redueix la dotació cromosòmica a la meitat, per donar lloc a cèl·lules haploides. S'inicia amb la duplicació i recombinació del material genètic patern i matern dels espermatòcits primaris, continua amb una divisió mitòtica que origina espermatòcits secundaris i finalitza amb una nova divisió per a formar espermatides rodones.
- Durant l'**espermiogènesi** hi ha la diferenciació i maduració de les espermatides per originar gàmetes masculines. Les espermatides es transformen en cèl·lules altament diferenciades i polaritzades (vegeu Figura 2). El flagel és la primera estructura que es desenvolupa durant l'espermatogènesi; al mateix temps hi ha una reorganització de les mitocòndries per formar una hèlix al voltant de la peça intermèdia del flagel. Més o menys simultàniament es forma l'acrosoma, vesícula secretora situada en el cap de l'espermatozoide: l'aparell de Golgi produeix petites vacuoles condensades que contenen un material dens (grànuls postacrosomals), les quals formaran la vesícula acrosomal. La membrana plasmàtica s'apropa al nucli degut a una redistribució dels orgànuls de la cèl·lula, quedant l'acrosoma al mig. L'ADN del nucli comença a condensar per canvis en les histones i altres proteïnes

Introducció

bàsiques específiques que s'associen amb l'ADN. Al mateix temps, la cèl·lula s'allarga i el citoplasma s'estén al llarg del flagel. L'acrosoma para de créixer i l'aparell de Golgi migra cap a la zona caudal de l'espermàtida. El volum de la l'espermàtida disminueix fins aproximadament un 25% del seu volum original, degut a la pèrdua d'aigua i a la pèrdua de citoplasma per l'expulsió de cossos residuals a partir de l'epiteli. Aquests cossos residuals contenen ARN empaquetat i orgànuls tals com l'aparell de Golgi, el reticle endoplasmàtic (RE), lisosomes i peroxisomes.

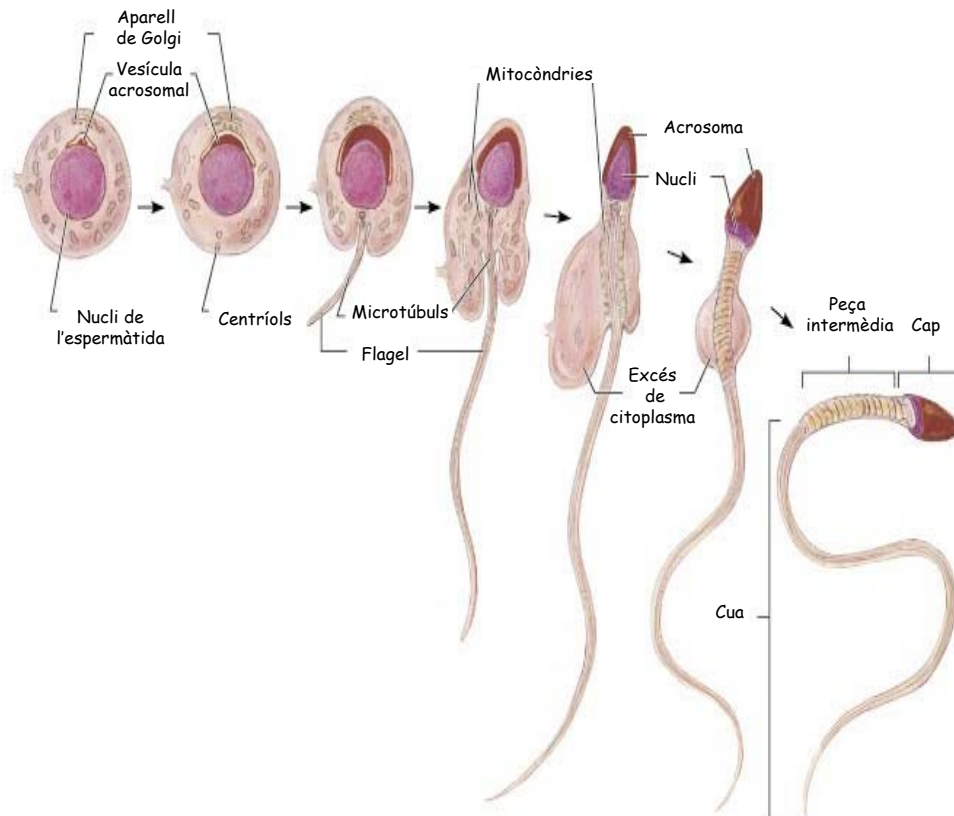


Figura 2 Espermiogènesi, durant la qual es pot observar la progressiva condensació del nucli, la formació del flagel i de l'acrosoma, i la reducció del citoplasma.

L'espermatogènesi depèn de l'entorn específic donat per les cèl·lules somàtiques que hi ha en els testicles: les cèl·lules de Sertoli i les cèl·lules de Leydig. L'associació d'espermatogònies amb cèl·lules de Sertoli per tot

l'epitel·li dels tubs seminífers és crítica per a la progressió de les cèl·lules germinals. Les cèl·lules de Sertoli presenten receptors de membrana per a la testosterona secretada per les cèl·lules de Leydig. La testosterona produïda per les cèl·lules de Leydig es mou pels tubs seminífers per difusió simple o facilitada. Es requereixen concentracions intratesticulars altes de testosterona per a que l'espermatogènesi sigui eficaç, sobretot per al procés de la meiosi (vegeu *reviews* (Abou-Haila i Tulsiani 2000) i (Parks i col. 2003)).

1.3 Maduració dels espermatozoides

Degut a la pèrdua de molts dels orgànuls i de la transcripció de l'ADN, en l'espermatozoide no hi ha expressió de proteïnes ni transport vesicular. Això implica que la membrana plasmàtica sigui estable i que, metabòlicament, sigui una estructura inert, ja que ni proteïnes, ni fosfolípids, ni colesterol ni cap altre component de la membrana plasmàtica poden ser sintetitzats de nou. No obstant, la membrana plasmàtica dels espermatozoides no és encara totalment madura. Aquesta membrana es compon d'una barreja de lípids i d'un contingut en proteïnes que són modificats durant el pas de l'espermatozoide per l'epidídim. Aquests canvis són específics per a cada espècie (boc (Rana i col. 1991), porc (Nikolopoulou i col. 1985), rata (Avelldano i col. 1992), toro (Poulos i col. 1973), xai (Poulos i col. 1975)). També es poden donar canvis en la difusió dels lípids de membrana (James i col. 1999; Christova i col. 2002). Un altre fenomen que pot tenir lloc durant la maduració, i que també depèn de cada espècie, és la reorganització dels esterols (boc (Rana i col. 1991), porc (Nikolopoulou i col.

1985), xai (Parks i Hammerstedt 1985)) que pot donar lloc a un canvi en la relació colesterol/fosfolípid.

Aquest procés de maduració també implica una modificació de la superfície de l'espermatozoide per proteïnes epididimals que són sintetitzades i secretades sota control androgènic (Orgebin-Crist i Jahad 1979). Així, durant el pas de l'espermatozoide per l'epidídim, la membrana plasmàtica canvia per la inactivació (Mishra i col. 2003), pèrdua (Tulsiani i col. 1995), modificació (Navaneetham i col. 1996; Srivastava i Olson 1996; Olson i col. 1997; Olson i col. 1998; Ursini i col. 1999; Srivastav 2000; Petrunkina i col. 2003) i adsorció (Feuchter i col. 1981; Vernon i col. 1985; Vernon i col. 1987; Moore i col. 1989; Frenette i col. 2002) de proteïnes. El paper d'aquestes alteracions no és encara del tot clar, encara que ja se sap que algunes proteïnes estan involucrades en la unió de l'espermatozoide amb l'oòcit (vegeu *review* (Topfer-Petersen i col. 1998)).

Per a totes les espècies de mamífer estudiades fins ara, cal que llurs espermatozoides passin a través de l'epidídim per tal de desenvolupar les característiques que són essencials per a la posterior fertilització de l'oòcit: la capacitat de moure's i la capacitat d'unir-se a la zona pel·lúcida, per posteriorment poder penetrar l'oòcit. Així doncs, la principal funció de la maduració és proveir a l'espermatozoide de l'infraestructura correcta per a la posterior fertilització de l'oòcit.

1.4 El plasma seminal

Els espermatozoides ejaculats són conduïts dins del tracte genital femení mitjançant el plasma seminal. Plasma seminal i espermatozoides junts són denominats sota un sol nom, semen. Les secrecions de les glàndules annexes constitueixen aproximadament tres quartes parts del plasma seminal d'un ejaculat (Fournier-Delpech i Thibault 1991); així doncs la contribució de l'epidídim és molt petita. *In vitro* el fluid seminal no té perquè ser essencial per a una correcta funció de l'espermatozoide; no obstant, *in vivo*, els espermatozoides requereixen un "vehicle fluid" per al seu transport. Així, el plasma seminal, a més a més de proveir els espermatozoides d'un medi de transport, subministra factors nutricionals com la fructosa i el sorbitol, juga un paper de tampó en alcalinitzar el pH, inicialment àcid, dels fluids vaginals de la femella i protegeix els espermatozoides de la seva exposició a agents oxidants. I no només això, el plasma seminal també pot contenir una quantitat variable de leucòcits fet que evita infeccions causades per agents de transmissió sexual (Johnson i Everitt 2000).

Els espermatozoides ejaculats, però no capacitats, adsorbeixen glicoproteïnes en la seva superfície procedents, principalment, del plasma seminal. S'ha descrit que un sol dels tipus de *coating proteins* que pertanyen a la família de les espermadhesines és suficientment abundant com per cobrir un terç de la superfície sencera del cap de l'espermatozoide. Aquestes espermadhesines i altres *coating proteins* podrien interactuar i unir-se amb els fosfolípids (Dostalova i col. 1995b). Aquestes proteïnes

estan involucrades, com a mínim, en dos aspectes importants de la fecundació: en el bloqueig temporal de la capacitació dels espermatozoides i en la interacció espermatozoide-oòcit (Calvete i col. 1993; Dostalova i col. 1995a). Les espermadhesines semblen estar relacionades amb les proteïnes majoritàries del plasma seminal de toro, designades com BSP (per *bovine seminal plasma*) ja que també tenen afinitat per l'heparina (Chandonnet i col. 1990; Desnoyers i Manjunath 1992).

1.5 Característiques morfològiques de l'espermatozoide madur

L'espermatozoide és una cèl·lula altament especialitzada i polaritzada (Holt 1984; Peterson i Russell 1985). A grans trets, distingim en els espermatozoides madurs tres grans regions altament especialitzades (vegeu Figura 3):

- el cap, involucrat en la interacció espermatozoide-oòcit.
- la peça intermèdia, on hi ha localitzades les mitocòndries, involucrades en la producció d'energia.
- el flagel, involucrat en la motilitat.

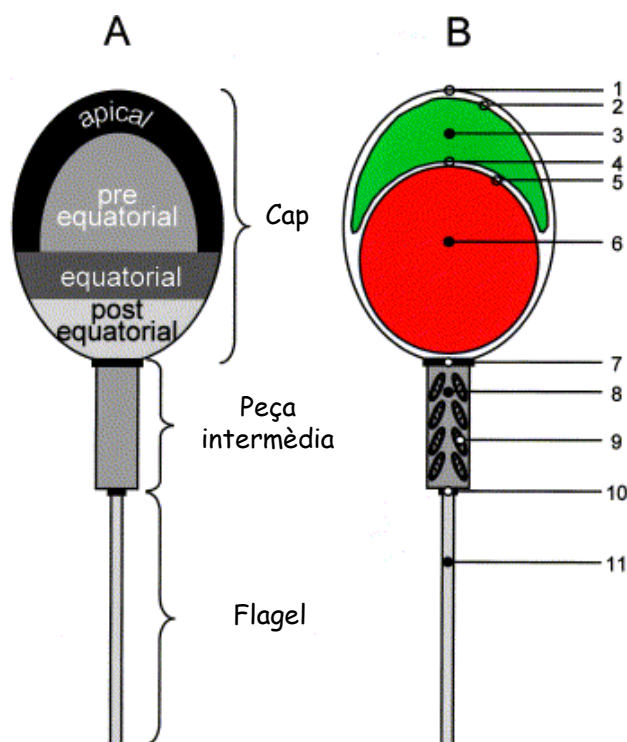


Figura 3 Representació esquemàtica d'un espermatozoide de mamífer (Flesch i Gadella 2000). A) Representació superficial i B) representació transversal. 1: membrana plasmàtica; 2: membrana acrosomal externa; 3: contingut acrosomal; 4: membrana acrosomal interna; 5: membrana nuclear; 6: nucli; 7: anell posterior o nuclear; 8: peça intermèdia; 9: mitocòndries; 10: anell flagel·lar; 11: flagel.

El cap, com la resta de l'espermatozoide, està envoltat per la membrana plasmàtica, la superfície externa de la qual és coberta de glicoproteïnes (*coating proteins*) relacionades amb el bloqueig temporal de la capacitació. Entre la membrana plasmàtica i el nucli només hi ha citoplasma, sense cap estructura, excepte l'acrosoma, situat en la regió apical del cap. És una vesícula gran, limitada per una membrana, originada a partir de l'aparell de Golgi i que conté els enzims que permetran la fecundació: la seva principal funció serà digerir el *cumulus* i la zona pel·lúcida de l'oòcit després de la reacció acrosòmica i durant la penetració de l'oòcit (Flesch i Gadella 2000). La membrana plasmàtica i la membrana acrosomal externa són prou

properes (vegeu Figura 3) perquè durant la reacció acrosòmica es puguin fusionar (vegeu apartat 1.8).

La peça intermèdia conté les mitocondries les quals produeixen ATP. Les proteïnes de dineïna, que estan unides als microtúbuls del flagel, hidrolitzen l'ATP i converteixen l'energia química alliberada en energia mecànica, la qual propulsa l'espermatozoide. Per tant, la peça intermèdia i el flagel són els responsables de la mobilitat de l'espermatozoide (Yanagimachi 1994).

1.6 Composició lipídica de la membrana plasmàtica

La composició lipídica de la membrana plasmàtica de l'espermatozoide madur de mamífer és marcadament diferent de la de les cèl·lules somàtiques. En el cas dels espermatozoides madurs de boc (Rana i col. 1991), els lípids de membrana majoritaris són: un 75% de fosfolípids, un 15% de lípids neutres i un 10% de glicolípid. Els fosfolípids majoritaris són la fosfatidilcolina (PC), la fosfatidiletanolamina (PE) i l'esfingomielina (Sph). Durant la maduració epididimal hi ha un decreixement, aproximadament del 25%, en el contingut total de lípids, del 30% en el contingut de fosfolípids i del 80% en el dels glicolípid. De tots els fosfolípids la diacilfosfatidiletanolamina (PE) és la que decreix més marcadament (un 65%) durant la maduració. Els esterols representen gairebé el 75% del total de lípids neutres, essent el colesterol el component majoritari (95% dels esterols). La maduració dels espermatozoides és associada amb un marcat increment d'esterols (aproximadament d'un 60%). Les relacions colesterol/fosfolípid i àcids grassos saturats/àcids grassos insaturats

incrementen notablement durant la maduració dels espermatozoides. La relació colesterol/fosfolípid en l'espermatozoide madur de boc és de 0.59 (mol/mol). Aquestes alteracions lipídiques donen lloc a canvis en la fluïdesa de la membrana i juguen un paper molt important en l'estructura i en les funcions de la bicapa lipídica.

1.7 Capacitació

Un espermatozoide de mamífer acabat d'ejacular no és capaç de fecundar un oòcit. Per ser-ho, ha de sofrir una sèrie de modificacions bioquímiques i biofísiques en la membrana plasmàtica, que culminaran amb la reacció acrosòmica. Així, per capacitació s'entén totes aquelles modificacions que fan a l'espermatozoide capaç de fecundar un oòcit. Aquest procés *in vivo* té lloc durant el pas dels espermatozoides pel tracte genital femení. A nivell morfològic no s'observen canvis (Fournier-Delpech i Thibault 1991).

La capacitació és associada amb el desenvolupament d'un patró de motilitat diferent, anomenat hiperactivació, el qual es caracteritza per uns moviments flagel·lars molt pronunciats i un moviment del cap de l'espermatozoide no lineal. Si el desenvolupament d'aquesta hiperactivació té relació amb els canvis bioquímics i biofísics que tenen lloc durant la capacitació encara avui és tema de debat. S'ha demostrat però que, durant la capacitació, hi ha modificacions a nivell mitocondrial, les quals podrien ser rellevants pel desenvolupament de la hiperactivitat (Vorup-Jensen i col. 1999). Però potser el canvi més important que experimenta l'espermatozoide durant la capacitació és l'adquisició de la capacitat de "reaccionar" o de

sofrir la reacció acrosòmica com a resposta a estímuls fisiològics, tals com la proteïna 3 de la zona pel·lúcida (ZP3) (Florman 1994) i la progesterona (Baldi i col. 1998).

Així doncs, la capacitació sembla imprescindible per a tots els espermatozoides de mamífer, i es pot donar molt ràpidament quan el plasma seminal (vegeu 1.4) ha estat eliminat (Cross 1996b). Cal tenir en compte, però, que no tots els espermatozoides d'un ejaculat són capacitables. Les lectines o anticossos específics d'espermatozoide no es fixen ni a tots els espermatozoides ni d'una manera idèntica. Això suggereix una heterogeneïtat en els espermatozoides ejaculats; la capacitació és asincrònica, tant *in vivo* com *in vitro*. *In vivo*, les poques desenes d'espermatozoides, presents en la trompa en el moment de l'ovulació, tenen tots la capacitat de fecundar l'oòcit.

Malauradament, encara no hi ha un mètode ben definit que permeti distingir els espermatozoides capacitats dels no capacitats. Així, la majoria d'autors mesuren la capacitació indirectament, mesurant el percentatge d'espermatozoides que han sofert la reacció acrosòmica, ja que tot espermatozoide "reaccionat" haurà hagut d'haver-se capacitat abans. Cal tenir en compte, però, que no tots els espermatozoides capacitats acabaran "reaccionant"; per tant aquesta mesura només serà orientativa.

1.7.1 Eliminació del plasma seminal

In vivo, en l'ejaculació, els espermatozoides deixen el plasma seminal (vegeu 1.4), que és eliminat per fagocitosi pels macròfags i per absorció per les cèl·lules epitelials, i passen a les secrecions genitals femenines. Estudis *in vitro* confirmen la necessitat d'eliminar acuradament el plasma seminal per tal que la capacitació es pugui produir. Això s'aconsegueix ja sigui per centrifugació o per migració ascendent espontània (*swim up*). Inversament, si es torna a posar en contacte espermatozoides capacitats amb plasma seminal o amb fraccions d'aquest plasma obtingudes per centrifugació (vesícules de diferents grandàries) se'ls descapacita (Cross 1996b).

Tal i com ja s'ha dit en l'apartat 1.3, durant el pas dels espermatozoides per l'epidídim, es poden fixar diferents proteïnes sobre la seva superfície. D'altres components protèics, provinents de secrecions de glàndules annexes, es poden adsorbir també en el moment de l'ejaculació i contribuir al blocatge temporal de la capacitació.

1.7.2 Organització de la membrana plasmàtica

Com ja s'ha mencionat (1.5) l'espermatozoide està dividit en tres grans compartiments: el cap, la peça intermèdia i la cua. La membrana plasmàtica d'aquests compartiments està separada en tres dominis, que es correspondrien amb els esmentats compartiments, per dues estructures especialitzades: l'anell nuclear i l'anell flagel·lar (vegeu Figura 3) (Cowan i Myles 1993). Aquests anells impedeixen la difusió lateral de proteïnes i de lípids d'un domini a un altre de la membrana plasmàtica (Holt 1984).

Molts autors, però, han demostrat que glicoconjugats de membrana (Cross i Overstreet 1987; Bearer i Friend 1990; Nikolajczyk i O'Rand 1992), proteïnes integrals de membrana (Myles i Primakoff 1984; Peterson i col. 1987) i lípids (Bearer i Friend 1982; Wolf i col. 1988; Wolf i col. 1990) estan organitzats en més subdominis que els tres descrits anteriorment. Inicialment, estudis d'unió d'anticossos (Saxena i col. 1986), estudis d'unió de lectines (Cowan i col. 1991) i estudis de criofractura (Aguas i Pinto da Silva 1983) van demostrar que les proteïnes integrals de membrana i els glicoconjugats de la membrana plasmàtica de l'espermatozoide s'organitzaven en subdominis (Peterson i Russell 1985). Cal remarcar que, en aquest cas, no hi ha barreres estructurals, com els esmentats anells, que impedeixin la difusió lateral d'aquestes molècules entre els subdominis (Ladha 1998).

Paral·lelament amb els canvis fisiològics que sofreix l'espermatozoide també s'han observat canvis en la distribució de les proteïnes integrals de membrana entre els subdominis, per exemple durant la maduració epididimal (Toyama i Nagano 1988), la capacitació (Cross i Overstreet 1987) i la unió a la zona pel·lúcida (O'Rand i Fisher 1987; Richardson i col. 1991; Nikolajczyk i O'Rand 1992). Durant aquests processos l'espermatozoide es troba amb una sèrie de canvis en l'entorn extracel·lular que probablement indueixen una migració de les proteïnes transmembranals i perifèriques d'un subdomini a un altre de la membrana plasmàtica.

Altres autors han trobat que els lípids de la membrana plasmàtica del cap també s'organitzen en dominis diferents. Aquesta polaritat lipídica

s'ha observat per fluorescència mitjançant marcadors de fluïdesa (Wolf i Voglmayr 1984; Holt i North 1986; Wolf i col. 1986a; Wolf i col. 1988; Wolfe i col. 1998), per sondes d'unió a lípids (Suzuki i Yanagimachi 1989; Bearer i Friend 1990; Gadella i col. 1994; Gadella i col. 1995) i per calorimetria diferencial de rastreig (DSC) (Wolf i col. 1990; Wolf 1995). També s'ha trobat una reorganització lipídica durant la maduració epididimal (Wolf i Voglmayr 1984; James i col. 1999) i durant la capacitació (Bearer i Friend 1982; Wolf i col. 1986c; Bearer i Friend 1990; Gadella i col. 1995), comparable a la que s'ha trobat per proteïnes.

Només és recentment que l'heterogeneïtat de la membrana plasmàtica s'ha fet evident. Les diferències entre les diferents regions denoten una clara especialització de la membrana plasmàtica. Així s'han observat 5 subdominis diferents en la membrana del cap dels espermatozoides de mamífer (vegeu Figura 3) (Flesch i Gadella 2000): la zona apical, la zona pre-equatorial, el segment equatorial i el postacrosoma (Gadella i col. 1995). La zona apical correspon a la zona d'unió dels espermatozoides capacitats amb la matriu extracel·lular de l'oòcit; la regió acrosomal de la membrana plasmàtica és altament fusogènica i durant la reacció acrosòmica es fusiona amb la membrana acrosomal externa. El segment equatorial és la zona que, en els espermatozoides que hagin sofert la reacció acrosòmica apropiadament i hagin penetrat la zona pel·lúcida, es podrà fusionar amb la membrana plasmàtica de l'oòcit (oolema). En canvi, el segment post-acrosomal de la membrana plasmàtica no és gens fusogènic (vegeu *reviews* (Flesch i Gadella 2000; Gadella i col. 2001)).

1.7.3 Sortida de colesterol

La membrana plasmàtica de l'espermatozoide ejaculat conté una proporció relativament elevada de colesterol i de sulfats d'esterols (Rana i col. 1991). La relació molar colesterol/fosfolípids decreix durant la capacitació per pèrdua d'esterols lliures o lligats (sulfats de colesterol i de desmosterol) (Hoshi i col. 1990), aquests darrers alliberats per una activitat sulfatasa (Benoff 1993). El colesterol és conegut per regular la fluïdesa i la permeabilitat de les membranes (Yeagle 1991) i per modular la mobilitat lateral de les proteïnes de membrana (Benoff i col. 1993d). El moviment de *flip-flop* dels fosfolípids, és a dir, el pas d'una capa a l'altra de la membrana, és marcadament restringit en incrementar la rigidesa deguda a la presència de colesterol en la bicapa (John i col. 2002). La sortida de colesterol de la membrana de l'espermatozoide, i per tant la disminució de la relació colesterol/fosfolípid, constitueix una important etapa en la capacitació dels espermatozoides (Davis 1981; Hoshi i col. 1990).

Per tal d'estudiar la distribució del colesterol en les membranes s'ha utilitzat una molècula, la filipina, que a l'unir-se amb el colesterol forma uns complexos anomenats FSCs (*filipin-sterol complexes*), que es poden visualitzar per criofractura (Bradley i col. 1980). Segons Toshimori i col. mentre que la membrana acrosomal (tant la interna com l'externa) presenta una elevada concentració d'aquests complexos, la membrana plasmàtica de la regió postacrosomal i de la cua gairebé no en presenten (Toshimori i col. 1985). En capacitar espermatozoides de hàmsster el número d'aquests complexos en la membrana plasmàtica periacrosomal es veu reduït (Suzuki i

Yanagimachi 1989). Aquesta membrana periacrosòmica, rica en colesterol (Parks i col. 1987), és la regió per on tindrà lloc la fusió de membranes plasmàtica i acrosomal externa durant la reacció acrosòmica (Flaherty i Olson 1988). Nolan i Hammersted van proposar un model per a la regulació de l'estabilitat de la membrana plasmàtica que envolta l'acrosoma (Nolan i Hammerstedt 1997): el colesterol, que assegura l'estabilitat d'aquesta membrana i que en manté l'asimetria lipídica, seria eliminat durant el pas dels espermatozoides pel tracte genital femení, provocant la desestabilitació d'aquesta membrana en preparació per a la reacció acrosòmica (fusió de membranes). Tanmateix, encara resta per verificar de quins dominis és eliminat el colesterol durant la capacitació.

1.7.4 Acceptors de colesterol

L'albumina i les lipoproteïnes d'alta densitat presents en el tracte genital femení actuen com a acceptors d'esterols i indueixen una sortida de colesterol de la membrana dels espermatozoides (Davis i col. 1980; Go i Wolf 1985; Langlais i col. 1988; Ehrenwald i col. 1990; Therien i col. 1998; Osheroff i col. 1999). La sortida de colesterol de l'espermatozoide humà després de quatre hores de capacitació en presència de fluid fol·licular humà o de sèrum és al voltant del 50% del total del colesterol contingut en els espermatozoides (Langlais i col. 1988). Per altra banda, espermatozoides de ratolí incubats amb albumina sèrica bovina (BSA) durant 60 minuts perden entre un 30% i un 50% dels esterols, dependent del temps (Go i Wolf 1985).

Contràriament, albúmines suficientment enriquides amb colesterol, les quals, per tant, tenen saturats els llocs d'unió a esterols, inhibeixen la fertilització (Go i Wolf 1985).

El sèrum sanguini sembla ser més eficaç que l'albumina sèrica, ja que conté lipoproteïnes (HDL, LDL, VLDL) que capten millor el colesterol que l'albumina (11%, 40% i 44% respectivament contra 7%) (Langlais i col. 1988). El líquid fol·licular és igualment un acceptor eficaç, per la presència d'HDL (Langlais i col. 1988).

També s'han utilitzat liposomes lliures de colesterol per capacitar *in vitro*. Espermatozoides bovins incubats durant 90 minuts en presència de liposomes lliures de colesterol perden al voltant d'un 30% del colesterol (Ehrenwald i col. 1988a). La incubació d'aquests espermatozoides amb lisofosfatidilcolina dona lloc a un 40% de cèl·lules que sofreixen la reacció acrosòmica, mentre que dels espermatozoides control (els quals no han perdut colesterol) només un 14% presenten RA (Ehrenwald i col. 1988b). La capacitat dels espermatozoides bovins de penetrar en oòcits de hàmmster desproveïts de zona pel·lúcida o en oòcits bovins madurs és marcadament incrementada si els espermatozoides han reduït el seu contingut en colesterol (Ehrenwald i col. 1988b). Aquests resultats suggereixen que la sortida de colesterol podria ser una de les etapes inicials en la capacitació dels espermatozoides de boví.

1.7.5 Fluïdesa de membrana

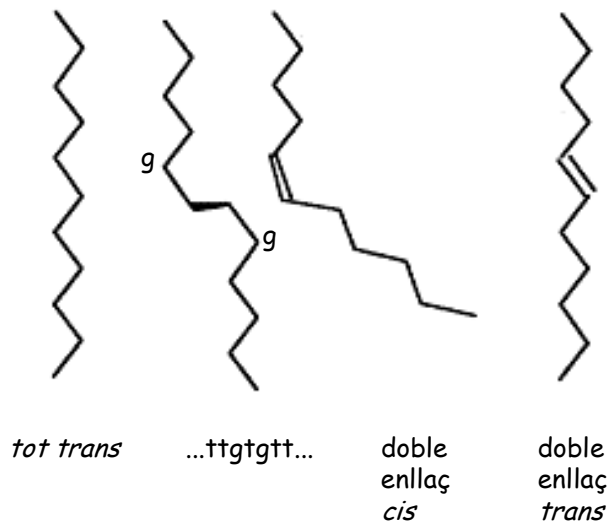


Figura 4 Les diferents configuracions d'una cadena hidrocarbonada d'àcid gras dels fosfolípids (Shechter 1990).

Els lípids que formen part de les membranes biològiques comparteixen un fet important: són molècules amfipàtiques. Això significa que tenen dues naturaleses, una hidrofílica, que té preferència per l'aigua, i l'altra hidrofòbica, que té aversió per l'aigua. Els més abundants són els fosfolípids; la part hidrofòbica d'aquests lípids deriva de les cadenes d'àcid gras que unides al *backbone* hidrofílic (glicerol o esfingosina). Hi pot haver gran varietat de residus d'àcid gras que difereixen en la longitud de la cadena hidrocarbonada, en el número de dobles enllaços i en la posició d'aquests. En una cadena hidrocarbonada, hi ha una rotació lliure al voltant dels enllaços C-C (vegeu Figura 4). La configuració potencialment més estable és la configuració *trans*. En una situació on les configuracions al voltant de tots els enllaços són de tipus *trans* (configuració *tot trans*), la cadena és estirada al màxim. El pas d'una configuració *tot trans* a una

configuració *gauche* al voltant d'un enllaç C-C necessita una petita quantitat d'energia, alguns KJ: l'agitació tèrmica del medi seria suficient per superar la barrera energètica. Una seqüència de configuracions ...*trans-trans-gauche-trans-gauche-trans-trans...* (...ttgtgtt...) comporta un canvi en la direcció de la cadena. Un doble enllaç en configuració *cis*, que són els que hi ha normalment als fosfolípids, també condueix a un canvi de direcció (Gennis 1989; Shechter 1990).

En presència d'aigua, i degut a les interaccions hidrofòbiques, la majoria dels fosfolípids formen espontàniament estructures en forma de làmines anomenades bicapes fosfolípídiques. Les cadenes laterals hidrocarbonades de cada monocapa minimitzen així el contacte amb l'aigua. Les interaccions de van der Waals (en concret les forces de London) entre les cadenes laterals hidrocarbonades dels fosfolípids contigus estableixen l'empaquetament. Són interaccions altament sensibles a la distància. Els grups hidrofílics dels caps polars estableixen interaccions electrostàtiques, entre dipols permanents o per ponts d'hidrogen, amb els caps polars de les molècules veïnes (Lewis i McElhaney 1992).

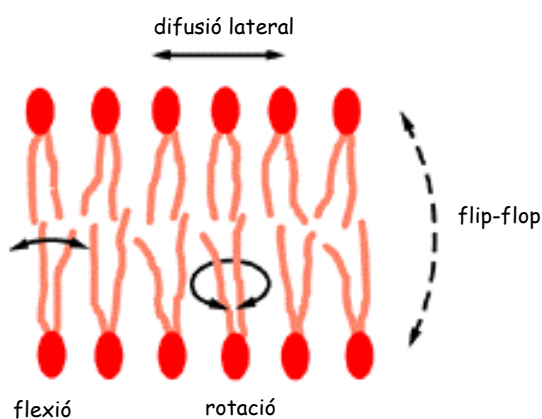


Figura 5 Esquema dels diferents moviments dels lípids que poden tenir lloc dins d'una membrana: rotació, difusió lateral, moviment de balanceig de les cadenes hidrocarbonades o flexió i difusió transversal o *flip-flop* (Alberts i col. 1994).

Els diferents constituents d'una membrana biològica, encara que estan confinats en un espai definit, no estan impeditos de tenir diversos moviments (Gennis 1989; van der Meer 1993). Els lípids poden girar al voltant del seu eix perpendicular al pla de la membrana (Figura 5). A més, degut a la llibertat de gir dels enllaços C-C, les cadenes hidrocarbonades dels lípids són flexibles. Aquests moviments a petita escala confereixen a la membrana una certa fluïdesa. Gràcies a aquesta fluïdesa les proteïnes poden girar sobre elles mateixes. Però, el més important és que aquesta fluïdesa permet moviments a més gran escala dels lípids i de les proteïnes dins del pla de la membrana: es tracta de la difusió lateral. D'altra banda la difusió transversal (*flip-flop*) dels lípids és molt més lenta en absència d'enzims específics, les flipases. En un medi isotròpic, homogeni, la fluïdesa (o la viscositat que és la seva inversa) representa una propietat general del medi i és funció inversa de la resistència al desplaçament en totes les direccions. Una membrana, en canvi, és un medi heterogeni i anisotròpic: la resistència al desplaçament no és la mateixa en totes les direccions.

En condicions fisiològiques, la fluïdesa de les membranes és d'unes cent vegades menor que la de l'aigua. La fluïdesa de membrana augmenta en augmentar la temperatura degut a la inducció de transicions ordre → desordre associades a la conformació de les cadenes hidrocarbonades dels lípids.

A temperatura suficientment baixa, totes les cadenes saturades dels lípids de la membrana tenen una configuració *tot-trans*. Les cadenes són paral·leles les unes amb les altres, en contacte estret i estirades al màxim; és una conformació ordenada o en fase gel (fase L_β) (Figura 6).

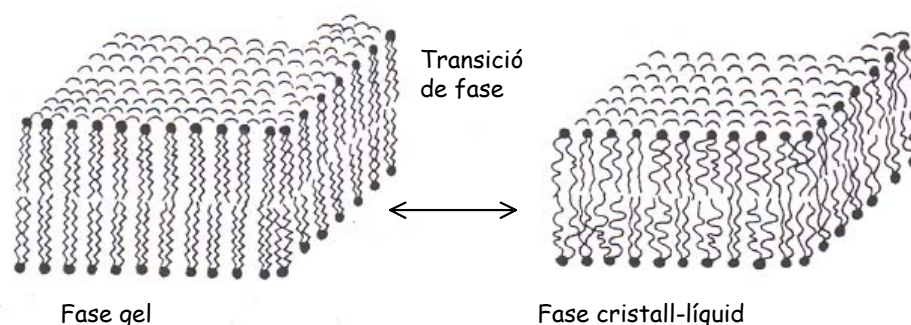


Figura 6 Les diferents conformacions de les cadenes hidrocarbonades dels lípids dins d'una bicapa (Mantsch i col. 1981).

A temperatures suficientment elevades, les cadenes ja no estan estirades al màxim; en conseqüència, en comparació amb la situació anterior, el gruix de la bicapa lipídica disminueix i el contacte entre les cadenes és menys estret. Els lípids estan més separats els uns dels altres; és una conformació desordenada o en fase cristall-líquid (fase L_{α}) (Figura 6) (Shechter 1990).

Una elevació de la temperatura comporta una mobilitat accentuada al voltant dels enllaços C-C. La probabilitat d'una isomerització *trans* \rightarrow *gauche* augmenta amb la temperatura i, a partir d'una determinada temperatura, s'observa una transició més o menys cooperativa: les cadenes passen d'una conformació ordenada (fase L_{β}) a una conformació desordenada (fase L_{α}). La temperatura de transició de fase (T_m) és aquella temperatura a la qual la meitat dels lípids estan en fase gel, mentre que l'altra meitat estan en fase cristall-líquid (Lewis i McElhaney 1992).

Tal com ja s'ha dit, el pas de l'estat ordenat a l'estat desordenat s'acompanya d'una expansió lateral dels lípids. De manera general, tot el que s'oposa a aquesta expansió s'oposa a la transició de fase i aquesta es

produirà a una temperatura més elevada. Les interaccions de van der Waals, que s'oposen a l'expansió, augmenten amb la llargada de les cadenes: en conseqüència, les temperatures de transició de fase dels lípids són més elevades com més llargues siguin aquestes cadenes. Les insaturacions (normalment en *cis*) desfavoreixen les interaccions entre cadenes veïnes (hi ha un canvi en la direcció de la cadena): en conseqüència, les temperatures de transició dels lípids disminueixen fortament amb el nombre d'insaturacions en *cis*. La transició de fase és un procés endotèrmic; el canvi d'entalpia és degut a l'energia requerida per a les isomeritzacions *trans-gauche* i per la disrupció de les forces de van der Waals entre fosfolípids contigus. Un altre factor important que influeix en la temperatura de transició de fase és la naturalesa del cap polar dels fosfolípids. La repulsió de càrregues entre caps polars propers carregats negativament pot causar una expansió lateral de la bicapa lipídica, afavorint l'estat cristall-líquid (Houslay i Stanley 1990).

Les transicions de fase més ben conegudes corresponen a les d'un sol lípid, principalment en fosfolípids saturats com la DPPC (Iijima i col. 1993). La transició de fase té lloc en un rang de temperatures molt estret, d'1 a 2°C, durant el qual les dues fases coexisteixen.

En el cas d'una mescla de lípids, la transició de l'estat ordenat a l'estat desordenat s'efectua de manera més complexa. La transició es pot estendre en un domini de temperatura més ample, comprès entre les temperatures de transició dels lípids purs de la mescla, i es poden observar dues o més transicions separades (Lewis i McElhaney 1992).

El fet que les membranes biològiques estiguin constituïdes per una mescla de lípids variats condueix a transicions que es poden estendre en un domini de temperatura més gran. Però, a més, d'entre tots els constituents de la membrana, solament els fosfolípids i els esfingolípids participen en les transicions de fase. El colesterol i les proteïnes no participen en aquestes transicions, però les pertorben.

El colesterol i els seus derivats constitueixen una altra classe important de lípids de membrana, els esterols. La seva estructura bàsica és un hidrocarbur de quatre anells condensats (vegeu Figura 7). El colesterol, per la seva composició també és una molècula amfipàtica, ja que conté un grup hidroxil que interacciona amb l'aigua. El colesterol pot constituir fins a un 50% dels lípids totals de certes membranes. S'insereix en la bicapa lipídica amb el seu eix perpendicular al pla de la membrana i els seus grups OH poden interaccionar amb les parts polars dels altres lípids de la membrana. El nucli tetracíclic rígid està en interacció amb les cadenes hidrocarbonades. La curta cadena hidrocarbonada del colesterol està situada cap el centre de la bicapa; és molt flexible i sempre resta desordenada (Figura 8) (Houslay i Stanley 1990).

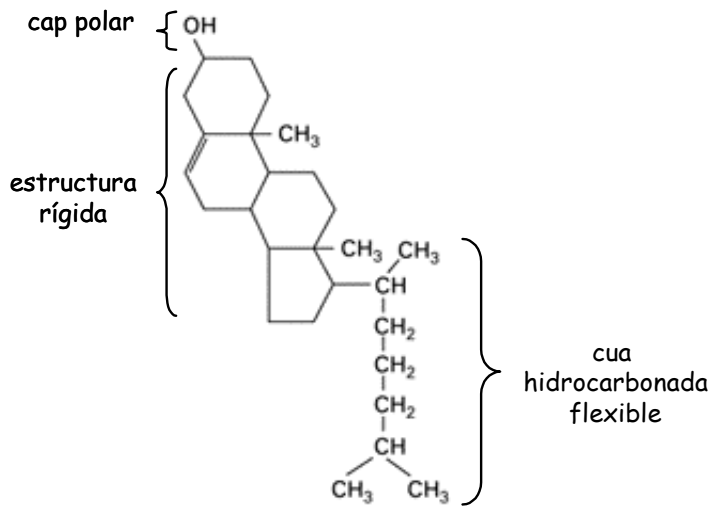


Figura 7 Representació esquemàtica de la molècula de colesterol (Stryer 1988).

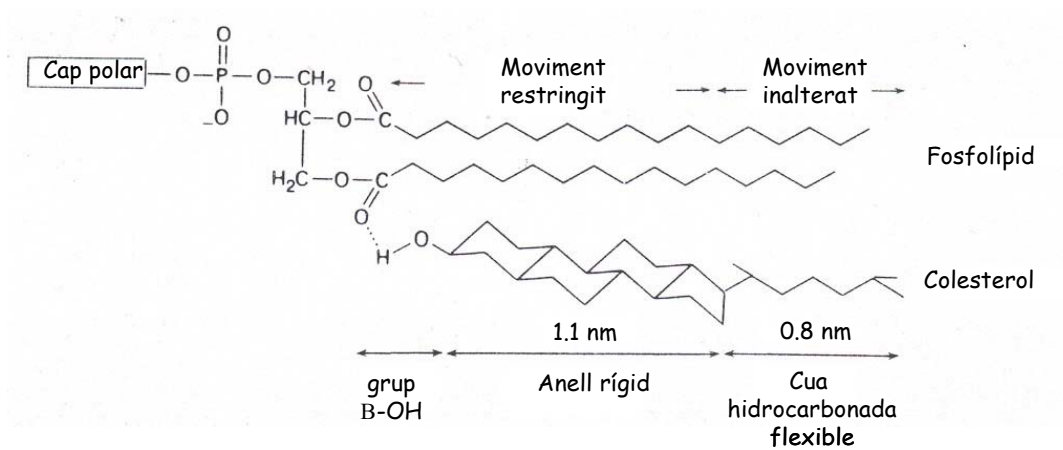


Figura 8 Dibuix esquemàtic de l'orientació de la molècula de colesterol entre els fosfolípids en una bicapa lipídica (Houslay i Stanley 1990).

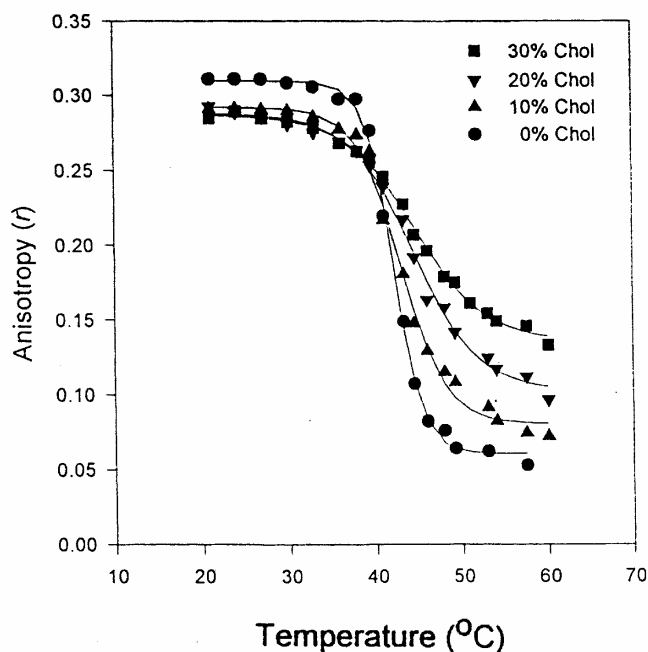


Figura 9 Efecte del colesterol en l'anisotropia de fluorescència enfront a la temperatura en vesícules de DPPC (Bhattacharya i Haldar 2000).

Les interaccions més ben conegudes entre colesterol i lípids són també les de fosfolípids saturats com la DPPC (Bhattacharya i Haldar 2000) (vegeu Figura 9). A baixes temperatures la cadena hidrocarbonada del colesterol, flexible i desordenada, dóna més espai als últims carbonis de les cadenes hidrocarbonades dels àcids grassos del fosfolípid. Això fa que, a aquestes temperatures, la bicapa es fluidifiqui i l'anisotropia de fluorescència (vegeu 3.3.1) sigui més baixa que en el cas del fosfolípid pur. A altes temperatures els anells rígids, situats en paral·lel amb els primers carbonis de les cadenes hidrocarbonades dels àcids grassos del fosfolípid, en restringeixen la seva mobilitat. Això fa que a aquestes temperatures la fluïdesa de membrana disminueixi i l'anisotropia sigui més alta que en el cas del lípid pur. Aquests efectes són més importants com més colesterol hi ha en la membrana. En conseqüència la transició de fase desapareix o es veu

greument reduïda (vegeu Figura 9). Així doncs, el colesterol emmascara les variacions de fluïdesa de membrana de fosfolípids purs saturats en funció de la temperatura: augment de la fluïdesa a baixes temperatures i disminució a altes temperatures.

Tanmateix, no és ben conegut si aquests mecanismes són aplicables a mescles de lípids tan complexos com els biològics.

1.8 La reacció acrosòmica

La reacció acrosòmica (RA) és un esdeveniment d'exocitosi que involucra múltiples fusions entre la membrana plasmàtica de l'espermatozoide i la membrana externa de l'acrosoma (Nagae i col. 1986). Recordem que l'acrosoma, estructura formada a partir de l'aparell de Golgi durant les etapes inicials de l'espermatagènesi (vegeu l'apartat 1.2), es troba situat en el cap de l'espermatozoide, per sobre del nucli. Durant la RA el contingut acrosomal (enzims hidrolítics i proteolítics) és alliberat a través de la membrana fenestrada (vegeu Figura 10). La conseqüència d'això és la hidròlisi i la desestructuració de la zona pel·lúcida que envolta l'òcit, permetent la seva fecundació. Només els espermatozoides capacitats són fisiològicament capaços de sofrir la RA com a resposta a estímuls apropiats. Per tant, els dos processos, capacitació i RA, estan seqüencialment i funcionalment lligats l'un a l'altre.

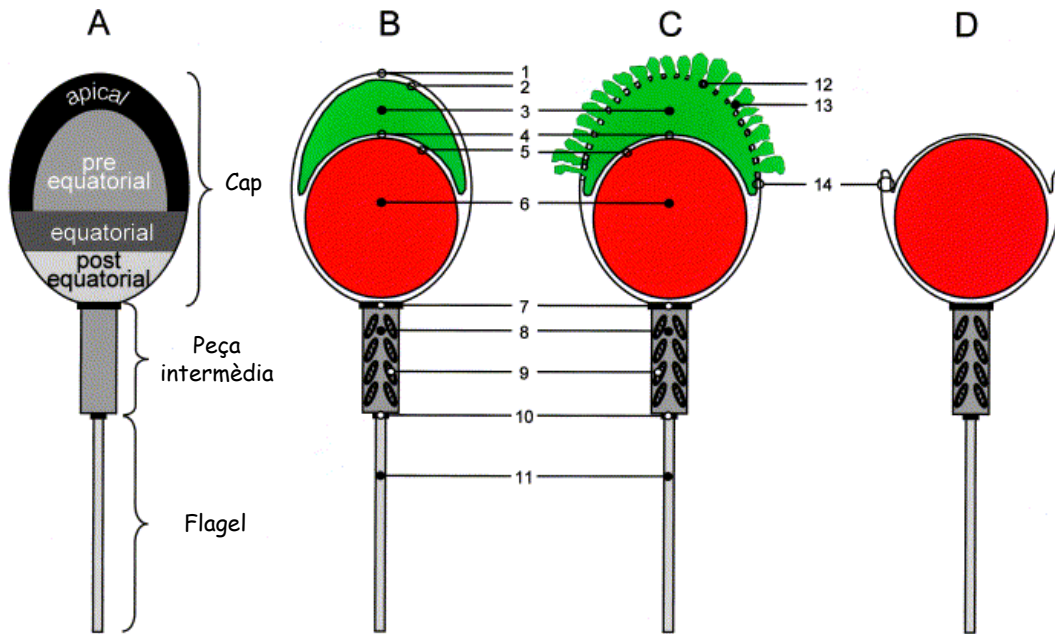


Figura 10 Representació esquemàtica d'un espermatozoide de mamífer (Flesch i Gadella 2000). A) Representació superficial, B) representació transversal, C) durant la reacció acrosòmica i D) després de la reacció acrosòmica. 1: membrana plasmàtica; 2: membrana acrosomal externa; 3: contingut acrosomal; 4: membrana acrosomal interna; 5: membrana nuclear; 6: nucli; 7: anell posterior o nuclear; 8: peça intermèdia; 9: mitocòndries; 10: anell anular; 11: flagel; 12: vesiculació (RA); 13: secreció acrosomal; 14: estructura en forma de *hairpin*.

La reacció acrosòmica pot ser induïda, com s'ha dit abans, per estímuls apropiats. En absència d'aquests estímuls només un percentatge baix d'espermatozoides humans sofreixen la RA, la qual és anomenada RA espontània (Pilikian i col. 1992). En la literatura s'ha descrit un llarg nombre de substàncies fisiològiques i no fisiològiques que s'han utilitzat per induir la RA tant en espermatozoides ejaculats com en els procedents de l'epidídim. L'inductor no fisiològic més emprat és el ionòfor de calci (A23187) (Szasz i col. 1997; Pereira i col. 2000; Ucar i Parkinson 2003). Els inductors fisiològics són substàncies que l'espermatozoide es trobarà durant la fertilització *in vivo*. Aquests inductors fisiològics semblen procedir del complex cumulus-oòcit (Meizel 1985; Tesarik 1985; Siiteri i col. 1988a; Bedford i col. 1997; Kaneko i col. 2001), com la progesterona (hormona

produïda durant l'ovulació) i derivats (Osman i col. 1989; Foresta i col. 1992; Parinaud i col. 1992; Saaranen i col. 1993; Tesarik i col. 1993; Crozet 1994; Kay i col. 1994; Melendrez i col. 1994; Brucker i Lipford 1995; Llanos i Anabalon 1996; Cao i col. 1997; Meizel i col. 1997; Baldi i col. 1998; Bronson i col. 1999; Somanath i col. 2000), o bé són provinents de la zona pel·lúcida, especialment la glicoproteïna ZP3, el seu major component (Cross i col. 1988; Kawakami i col. 1993; Henkel i col. 1998a; Abou-Haila i Tulsiani 2000) o bé del fluid fol·licular (Lui i col. 1977; Tesarik 1985; Siiteri i col. 1988b; Thomas i Meizel 1988; Yudin i col. 1988; Calvo i col. 1989; Mortimer i Camenzind 1989; Siegel i col. 1990; Hansen i col. 1991; Tarlatzis i col. 1993; Saragueta i col. 1994; Ruvolo i col. 1995; Fabbri i col. 1998; Henkel i col. 1998b; Rufas i col. 1998).

S'ha demostrat que molts mecanismes cel·lulars s'activen durant la RA (Baldi i col. 2000) però per a molts d'ells la relació causa-efecte encara no és clara; tampoc queda clar si són essencials pel procés de fertilització o bé només hi estan associats. El que sí és clar és que la RA és dependent de Ca^{2+} (vegeu els *reviews* (Breitbart 2002a; Breitbart 2002b; Jagannathan i col. 2002)). És interessant remarcar que el senyal de calci és diferent si l'estímul és la progesterona o bé la ZP. Mentre que per la progesterona s'ha descrit una corba bifàsica d'entrada de calci, consistent en un pic inicial molt ràpid seguit d'un llarg *plateau* (Baldi i col. 1998), la ZP3 indueix un increment de calci lent però mantingut (Florman 1994), semblant a la segona fase de la progesterona. Recentment, però, s'ha demostrat que la ZP3 pot induir un increment de la concentració de calci intracel·lular molt ràpid, de l'ordre de milisegons després de l'estimulació (Arnoult i col. 1999).

La mobilització de Ca^{2+} podria també facilitar la fusió de la membrana plasmàtica i la membrana acrosomal externa. La unió del Ca^{2+} amb fosfolípids aniònics (Berruti i Franchi 1986) i/o sulfat de colesterol (Cheetham i col. 1990) podria promoure la desestabilització de membrana. A més a més, el Ca^{2+} activa fosfolipases de membrana, com és ara la fosfolipasa A_2 (PLA₂) (Garde i Roldan 2000) que dóna lloc a lisofosfolípids, coneguts destabilitzadors de membrana; així la PLA₂, que es troba en l'acrosoma (Riffo i col. 1992), i els seus productes juguen un paper important en la reacció acrosòmica (Llanos i col. 1993; Riffo i Parraga 1996; Riffo i Parraga 1997; Riffo i Nieto 1999).

1.9 La capacitatció *in vitro*

Les condicions que s'estableixen en els experiments *in vitro* tendeixen a reproduir aquelles que hom creu que es donen *in vivo*:

- Eliminació del plasma seminal i resuspensió dels espermatozoides en medis que permeten la capacitatció i que mantenen la mobilitat (Cross 1996b).
- Presència d'un acceptor de colesterol, com és ara el sèrum sanguini (Langlais i col. 1988), l'albumina sèrica (Go i Wolf 1985) o bé les lipoproteïnes (Langlais i col. 1988).
- Altres autors també consideren important la presència d'heparina en el medi de capacitatció, la qual milloraria fortament el percentatge d'òcits fertilitzats *in vitro* en bovins (Parrish i col. 1988; Chauhan i col. 1997) i humans (Valencia i col. 1984) i acceleraria la reacció acrosòmica en equins (Varner i col. 1993). El fet que els

glucosaminoglicans, com l'heparina, siguin presents en el tracte genital de les femelles justifica el seu paper favorable en els medis de capacitació. Tanmateix, no es coneix encara la seva manera d'actuar exacte; el que sí que se sap és que afavoreixen l'entrada de Ca^{2+} (Cordoba i col. 1997).

- Per altres autors és també important la presència de progesterona en els medis de capacitació (Senuma i col. 2001). Per la majoria, però, la progesterona només és capaç d'induir la reacció acrosòmica si els espermatozoides han estat prèviament capacitats (Melendrez i col. 1994; Meyers i col. 1995; Therien i Manjunath 2003).
- Finalment, alguns autors han trobat que el bicarbonat també podria jugar un paper important en la capacitació dels espermatozoides (Boatman i Robbins 1991; Harrison i col. 1996), però no seria un requisit indispensable.

Tot i que ja se sap que durant la capacitació hi ha una sortida de colesterol, encara no està clar com aquesta sortida de colesterol pot afectar a la membrana plasmàtica dels espermatozoides i, consegüentment a la reacció acrosòmica. Tampoc està clar l'efecte de la progesterona i de l'heparina en els medis de capacitació *in vitro*.

2 OBJECTIUS

El nostre grup de recerca, a la Unitat de Biofísica, està interessat en l'estudi biofísic de sistemes lipídics, ja sigui en models de membrana com són els liposomes o bé en membranes biològiques. Les membranes dels espermatozoides presenten una elevada polarització i la dinàmica dels seus lípids ha de tenir un paper rellevant en la seva funció biològica. En aquest sentit hem establert una col·laboració amb el grup de recerca de l'Àrea d'Immunologia, del Departament de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i d'Immunologia, dirigit per la Dra. Paz Martínez, a l'Institut de Biotecnologia i Biomedicina (IBB) de la UAB. La nostra hipòtesi de treball és que el nivell de colesterol de les membranes dels espermatozoides està implicat en el conjunt d'esdeveniments que condueixen a la reacció acrosòmica (RA). Així, l'**objectiu general** d'aquesta tesi és determinar la possible repercussió de la sortida de colesterol de les membranes dels espermatozoides de boc sobre la seva capacitació i sobre la RA.

En aquest context, el **primer objectiu específic** que ens hem proposat és desenvolupar una metodologia que ens permeti induir, d'una manera controlada i reproducible, la sortida de colesterol de les membranes dels espermatozoides de boc. Així mateix també s'haurà de posar a punt les metodologies necessàries que ens permetin obtenir informació, a nivell biofísic, dels canvis induïts en aquestes membranes per la sortida de colesterol.

El **segon objectiu** d'aquest treball és el de caracteritzar, mitjançant l'estudi del comportament termotròpic, el sistema lipídic de les membranes dels espermatozoides i de determinar els possibles canvis en la fluïdesa i en

Objectius

l'organització i dinàmica dels lípids d'aquestes membranes durant la capacitació induïda per la sortida de colesterol.

En les membranes dels espermatozoides s'hi distingeixen diverses regions amb diferents propietats i funcions biològiques. El **tercer objectiu** d'aquesta tesi és, doncs, caracteritzar, des del punt de vista biofísic, aquests diferents macrodominis lipídics i determinar quins d'ells es veuen modificats per la sortida de colesterol. Es pretén així contribuir a la regionalització del procés de capacitació, a nivell molecular.

Un altre aspecte a considerar és la possible heterogeneïtat en la resposta de la població d'espermatozoides a la inducció de la capacitació. Així, el **quart i últim objectiu específic** d'aquesta tesi és la caracterització de les poblacions d'espermatozoides abans i després de la sortida de colesterol.

3 MATERIALS I MÈTODES

3.1 Materials

El material biològic objecte de l'estudi, els espermatozoides de boc, van ser recol·lectats pel mètode de la vagina artificial (vegeu apartat 3.2.1) i els mascles utilitzats en aquest treball van ser generosament cedits pel Departament de Producció Animal de la Facultat de Veterinària de la UAB.

3.1.1 Reactius

- Albúmina sèrica bovina, fracció V, lliure d'àcids grassos, de Boerinhger, Manheim, Alemanya.
- Albúmina sèrica humana, de Centeon, Sant Feliu de Llobregat, Espanya.
- β -ciclodextrina, de Fluka, Madrid, Espanya.
- Blau dextrà, de Sigma, Alcobendas, Espanya.
- Cloroform, al 99% estabilitzat amb etanol al 5%, de Scharlau, Barcelona, Espanya.
- Clorur fèrric, al 99%, de Merck, Darmstadt, Alemanya.
- Colesterol, al 99% de ICN Biochemicals Inc, Aurora, Ohio, USA.
- Dipalmitoilfosfatidilcolina, al 99% de Sigma, Alcobendas, Espanya.
- 1,6-difenil-1,3,5-hexatriè (DPH), de Molecular Probes, Leiden, Holanda.
- Filtre de paper separador de fases de Whatman Laboratory Division, Kent, Anglaterra.

- Fosfatidilcolina d'ou (EPC). Es va obtenir per extracció a partir de novell d'ou segons Singleton i col. (1965) i la seva puresa es va controlar per cromatografia en capa fina.
- Gel lubricant estèril K-Y, de Johnson & Johnson, Sezanne, França.
- Glutaraldehyd, de Fluka, Madrid, Espanya.
- Heparina, de Rovi, Madrid, Espanya.
- *Kit Colesterol HDL*, de BioSystems, Barcelona, Espanya.
- Marró Bismark, de Sigma, Alcobendas, Espanya.
- Medi d'incubació M-199, de Biological Industries, Beit Haemek, Israel (vegeu composició en l'annex).
- Medi d'incubació M-199 sense vermell de fenol, de Biological Insustries, Beit Haemek, Israel (vegeu composició en l'annex).
- Medi de muntatge DPX, de Probus, Badalona, Espanya.
- Merocianina 540, de Molecular Probes, Leiden, Holanda.
- Metanol, al 99.8% de Scharlau, Barcelona, Espanya.
- Nitrogen sec, de SEO (Sociedad Española de Oxígeno), Madrid, Espanya.
- Rosa Bengala, de Sigma, Alcobendas, Espanya.
- Tampó salí TBS (vegeu composició en l'annex).
- Tiocianat d'amoni, al 99%, de Merck, Darmstadt, Alemanya.
- *Triton X-100* pur, de Sigma, Alcobendas, Espanya.

3.1.2 Instruments utilitzats

- Agitador magnètic summergeble Variomag Electronicrührer Compact.
- Agitador rotatori Atom 85.
- Aspirador de líquids Dinko.

- Balances de precisió Sartorius Basic i Swis Quality.
- Bany d'aigua Stök Tronic E1.
- Bany Haake amb una estabilitat de $\pm 0.05^{\circ}\text{C}$ i amb una precisió de $\pm 0.01^{\circ}\text{C}$.
- Bunsen IBS Integra Biosciencies AG.
- Cambra de Neubauer de Blau Brand.
- Campana de flux Telstar.
- Centrífugues: IEC MicroMax, per tubs *Eppendorf*; Sorvall tc 6, de sobretaula, per a un màxim de 8 tubs i Heraeus Sepatech, refrigerada, per a més de 8 tubs.
- Citòmetre de flux FACScalibur Becton Dickinson equipat d'una làser d'argó de 15 mW.
- Comptador de cèl·lules Clay-Adams.
- Espectrofluorímetre SLM 8100 Aminco, proveït de 3 detectors en disposició T, de 3 polaritzadors, un pel canal d'excitació i dos pels canals d'emissió, de 2 monocromadors, un d'excitació i un d'emissió i d'una cubeta portamostres termostatitzada.
- Espectrofotòmetres Perkin Elmer model 320 i Cary 3 Bio.
- Incubador de CO_2 Forma Scientific, model Stericult, programat per a mantenir el CO_2 al 10% i la humitat al 90%.
- Lector d'ELISA Anthos Labtec Instruments.
- Microscopi òptic confocal Leica TCS 4D del Servei de Microscòpia de la UAB.
- Microscopi òptic Leitz Labovert.
- Microscopi Zeiss Axioplan dotat d'un equip d'epifluorescència.
- Pipetes automàtiques Gilson, Pipetman i Tecnorama.

- Sonicador Dynatech Sonic Dismembrator.
- *Vortex* Heidolph, Techno Kartell i KMS 1 Minishaker IKA.

3.2 Mètodes preparatius i analítics

3.2.1 Obtenció de la mostra

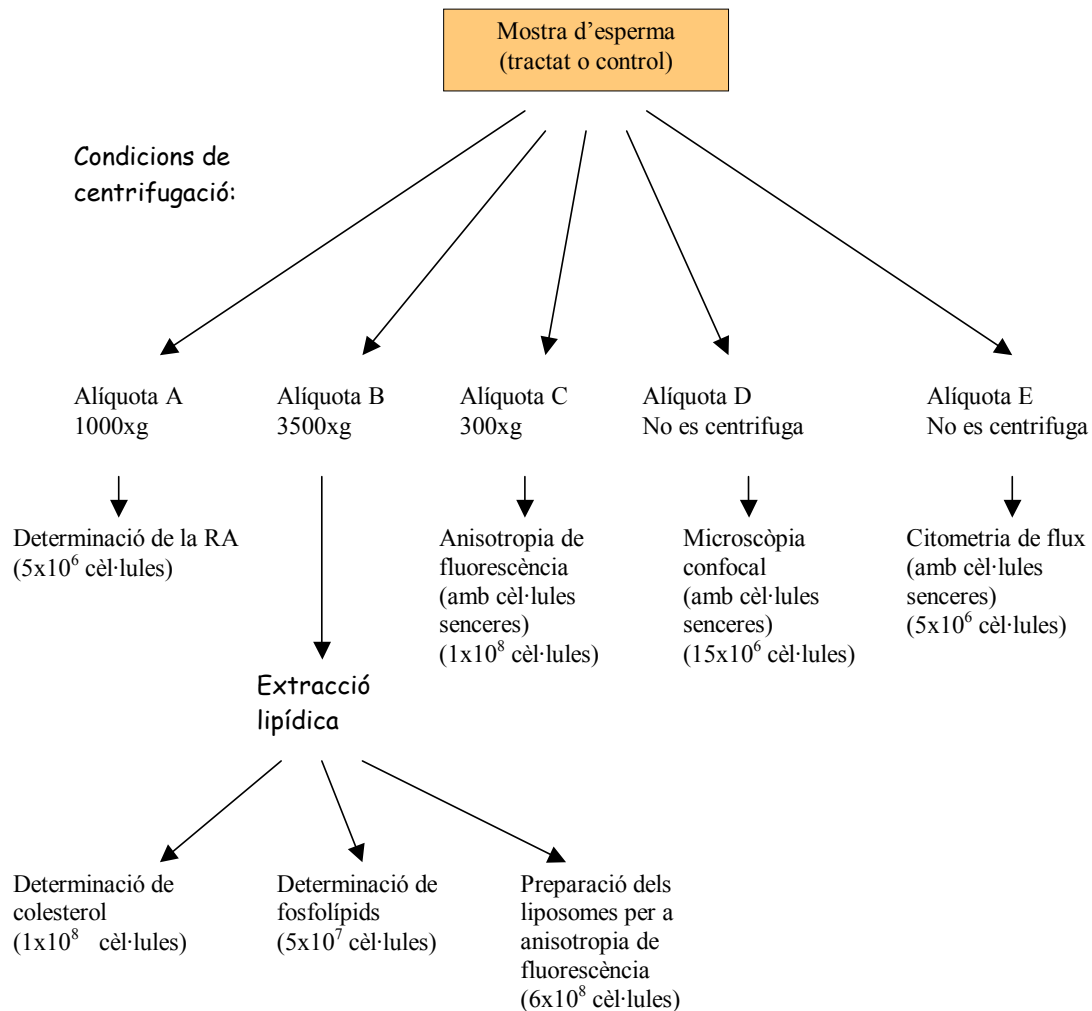
El nombre d'espermatozoides que conté un ejaculat de mamífer depèn de cada espècie. Així, per exemple, mentre l'ejaculat humà en sol tenir uns 100 milions, en uns 2 ml, l'ejaculat de boc en pot arribar a tenir uns 4.000 milions, també en uns 2 ml. En el present treball s'ha utilitzat exclusivament espermatozoides ejaculats de boc (*Capra hircus*, raça malaguenya), que ens ha estat generosament subministrat pel Departament de Producció Animal de la Facultat de Veterinària de la UAB.

Els espermatozoides van ser obtinguts per la tècnica de la vagina artificial. Aquesta està constituïda per dos cilindres concèntrics, l'interior de goma tova i l'exterior de goma dura. El cilindre exterior té una doble vàlvula, a través de la qual l'espai entre els cilindres s'omple, primer, d'aigua calenta, i després s'hi insufla aire; així queda un forat tens i calent. L'extrem que s'ofereix a l'animal s'unta amb un lubricant, i a l'altre extrem s'hi connecta un embut de làtex que al seu final porta un tub d'assaig on es recull la mostra. La vagina artificial era interposada entre el mascle i la femella per tal de recollir l'ejaculat en l'interior del tub. Immediatament després de la seva obtenció, la mostra, a l'interior d'un termo a 38° C, es va portar al laboratori i es va procedir a la seva manipulació.

3.2.2 Eliminació del plasma seminal

Per tal de separar les cèl·lules del plasma seminal, l'ejaculat es va centrifugar a 300xg durant 10 minuts en una centrífuga de sobretaula Sorvall tc 6. En treballs preliminars aquesta centrifugació s'havia fet a 650xg, però vàrem observar que en aquestes condicions es deterioraven les membranes. Així doncs, sempre que es volia preservar la integritat de les cèl·lules, es va fer la centrifugació a la mínima força centrífuga relativa que permetia la sedimentació de la major part dels espermatozoides, que era 300xg, durant 10 minuts. El sobrenedant es descartà i el sediment es va rentar dues vegades per resuspensió en 10 ml de medi M-199 (vegeu composició en l'apartat 8 (annex) seguida de centrifugació a 300xg durant 10 minuts, cada vegada. D'aquesta manera es van eliminar les restes de plasma seminal contingudes en el primer sediment. L'últim *pellet* es va resuspendre en un determinat volum de l'esmentat medi segons la quantitat de cèl·lules. Per tal de conèixer el nombre d'espermatozoides per ml de mostra, es va fixar una alíquota amb formaldehid a l'1% i, després de diverses dilucions (1/2000, 1/4000), es van fer recomptes de les cèl·lules utilitzant la cambra de Neubauer.

3.2.3 Modificació del contingut de colesterol dels espermatozoides i distribució de la mostra en alíquotes per als diferents estudis



Taula 1 Esquema de la distribució de la mostra per als diferents estudis.

Un determinat volum de l'ejaculat rentat (vegeu 3.2.2), que contingués el número d'espermatozoides necessari per a l'experiment a realitzar, es va portar a 7.5×10^7 cèl·lules / ml, per dilució amb medi M-199. La mostra es va incubar en una estufa *Steri-cult Incubator* a 37°C i al 10% de CO₂ durant diferents temps en presència o absència de β-ciclodextrina

(β CD) (vegeu apartat 4.1.3.1) o de BSA, com a acceptors de colesterol, a diferents concentracions.

El procés d'incubació es va aturar per dilució 1:5 amb tampó TBS o bé amb medi M-199 sense vermell de fenol (vegeu composició en l'apartat 8 (annex)) depenent de l'estudi a fer posteriorment, seguida immediatament de centrifugació i de dos rentats més amb el mateix tampó o medi, seguits també de centrifugació; d'aquesta manera s'eliminava la BSA o bé la β CD; les mostres s'havien d'utilitzar a continuació en la determinació de la reacció acrosòmica (RA) (alíquota A), en les anàlisis lipídiques (alíquota B) o bé en els estudis espectroscòpics de fluorescència (alíquota C); el nombre de cèl·lules i les característiques de la centrifugació, que havien de ser diferents per a cada cas, es descriuen a continuació (vegeu un esquema a la Taula 1). Pels estudis per microscòpia confocal (alíquota D) i per citometria de flux (alíquota E) el procés d'incubació no es va aturar ja que les cèl·lules es passaven a analitzar immediatament i ni la β CD ni la BSA interferien en l'anàlisi, tal i com s'havia comprovat prèviament.

3.2.3.1 Alíquota per a la determinació de la reacció acrosòmica i de la vitalitat

L'alíquota A, que contenia 5×10^6 espermatozoides, per a determinar la RA i la vitalitat, es va centrifugar a 1000xg durant 10 minuts, en una centrífuga IEC MicroMax per a tubs *Eppendorf*. El darrer sediment, després dels dos rentats (3.2.2) es va resuspendre en 100 μ L de tampó TBS (Taula 1).

3.2.3.2 Alíquota per a les anàlisis lipídiques i preparació de liposomes

L'alíquota B, que contenia 7.5×10^8 cèl·lules, per a les determinacions de la composició lipídica i per a la preparació de liposomes, es va centrifugar a 3500xg. En aquesta etapa s'utilitzà una centrifugació més enèrgica, 3500xg, per tal d'assegurar la sedimentació exhaustiva de les cèl·lules. En aquest pas, el possible deteriorament de les membranes no interferiria amb la posterior anàlisi lipídica o preparació de liposomes. Després dels dos rentats (3.2.2), el darrer sediment es resuspengué en TBS, a la concentració de 1×10^9 cèl·lules / ml. Aquesta suspensió es pot guardar a -20°C fins a la seva utilització (Taula 1).

3.2.3.3 Alíquota per als estudis d'anisotropia de fluorescència

L'alíquota C, que contenia 1×10^8 espermatozoides, es va centrifugar a 300xg per tal de no malmetre les membranes. Després dels dos rentats (vegeu 3.2.2) el sediment final es va resuspendre en 2 ml de medi M-199 sense vermell de fenol, que contenien aproximadament 5×10^7 cèl·lules/ ml, a punt pel marcatge fluorescent (Taula 1).

3.2.3.4 Alíquota per als estudis de microscòpia confocal

Per tal d'obtenir l'alíquota D es va prendre un volum de medi d'incubació que contingués 15×10^6 espermatozoides sense centrifugar, i es va resuspendre en 490 μL de M-199 sense vermell de fenol, quedant a punt pel marcatge amb MC 540 i amb Yo-Pro-1 (Taula 1).

3.2.3.5 Alíquota per als estudis de citometria de flux

Per tal d'obtenir l'alíquota E es va prendre un volum de medi d'incubació que contingués 5×10^6 espermatozoides sense centrifugar, i es va resuspendre en 490 μL de M-199 sense vermell de fenol, quedant a punt pel marcatge amb MC 540 i amb Yo-Pro-1 (Taula 1).

3.2.4 Valoració de la reacció acrosòmica i de la vitalitat dels espermatozoides

Per tal de valorar la reacció acrosòmica (RA) i la vitalitat dels espermatozoides s'utilitzà un mètode de triple tinció (Talbot i Chacon 1981) posat a punt pel grup d'Immunologia de la Reproducció de l'Institut de Biologia i Biomedicina (IBB). Les anàlisis es dugueren a terme en el laboratori de l'esmentat Institut. El protocol que es va seguir és el següent:

La suspensió (100 μL) d'espermatozoides rentats procedent de l'alíquota A (3.2.3.1) i que contenia de l'ordre de 5×10^6 espermatozoides, es va mesclar amb un volum igual de *Trypan blue* al 2%, es va incubar durant 15 minuts a 37°C i es va rentar amb tampó TBS dues vegades seguit de centrifugació a 1500xg durant 10 minuts. El sediment es va resuspendre en TBS i s'hi va afegir un volum igual de tampó cacodilat 0.1M que contenia un 3% de glutaraldehyd. La suspensió d'espermatozoides així obtinguda, que conté un 1.5% de glutaraldehyd, es pot deixar d'1 a 24h a 4°C . A continuació es va rentar la suspensió dues vegades amb aigua *miliQ*, seguit de centrifugació a 1500xg. El sediment es va resuspendre en un petit volum (50-100 μL) d'aigua *miliQ* i es va estendre sobre un portaobjectes, que es va

deixar assecar després a temperatura ambient. L'extensió, sobre dels portaobjectes, es va tenyir per immersió en una gaveta amb marró de Bismark durant 30 minuts a 37°C, es va rentar per l'anvers del portaobjectes amb aigua destil·lada i es va deixar assecar. A continuació, la mateixa extensió es va tenyir en una gaveta amb rosa de Bengala durant 10 minuts i en agitació suau, es va rentar també per l'anvers del portaobjectes amb aigua destil·lada i es va deixar assecar. Els portaobjectes es van muntar amb medi de muntatge DPX, es van deixar assecar i es va passar a l'observació en un microscopi Zeiss Axioplan dotat d'un equip d'epifluorescència.

3.2.4.1 Patrons de marcatge de la triple tinció

	Viu	Mort
"Reaccionat"	Acrosoma: Blanc Postacrosoma: Marró	Acrosoma: Blanc Postacrosoma: Negre
"No reaccionat"	Acrosoma: Rosa Postacrosoma: Marró	Acrosoma: Rosa Postacrosoma: Negre

Taula 2 Patrons de marcatge de la triple tinció (Talbot i Chacon 1981).

Mitjançant aquesta tinció es poden visualitzar quatre patrons morfològics diferents en l'espermatozoide. D'una banda ens permet de diferenciar entre espermatozoides vius i morts, i per altra banda, entre els que han sofert la reacció acrosòmica, "reaccionats", i els intactes. Els patrons es podrien definir esquemàticament com es veu en la Taula 2.

3.2.5 Extracció lipídica

L'extracció dels lípids totals continguts en els espermatozoides, es va dur a terme mitjançant el mètode de Bligh i Dyer (Bligh i Dyer 1959) modificat segons Wolf i col. (Wolf i col. 1988) per a mostres d'espermatozoides.

Cada dissolvent va ser mantingut sota corrent de nitrogen sec durant uns minuts per tal d'eliminar-ne l'oxigen i evitar així la posterior oxidació dels lípids.

A la suspensió en TBS, que contenia els espermatozoides control o tractats, segons s'ha descrit a l'apartat 3.2.3.2 (alíquota B), s'hi va afegir 3.75 ml de mescla cloroform-metanol (1:2 vol:vol) per cada ml de suspensió d'espermatozoides. En aquestes proporcions l'aigua, el metanol i el cloroform són miscibles i per tant donen una sola fase; la suspensió resultant es va deixar a la foscor en agitació rotativa enèrgica durant 2 hores i a 4°C. A continuació s'hi va afegir 1.25 ml de cloroform i 1.25 ml d'aigua destil·lada per cada ml de suspensió inicial. La mescla resultant es va agitar tot sacsejant els tubs vigorosament. Amb aquest tractament la suspensió forma dues fases encara que mal separades. La fase superior està constituïda per 4.5 ml d'aigua i metanol i presenta terbolesa degut principalment al precipitat de proteïnes que conté en suspensió. La fase inferior és clara i està constituïda per 2.5 ml de cloroform i conté en solució els lípids extrets de les cèl·lules. La mostra es va centrifugar a 300xg durant 15 minuts, operació que va facilitar la perfecta separació de les dues fases i la formació, just en la interfície, d'una làmina blanca ben delimitada, constituïda pel precipitat de proteïnes. Es va recollir la fase inferior (1^{er}

extracte lipídic) succionant amb pipeta Pasteur i es va passar immediatament a través d'un filtre separador de fases (Whatman 1PS); aquests tipus de filtres retenen les poques gotes d'aigua que puguin ser arrossegades junt amb la fase clorofòrmica.

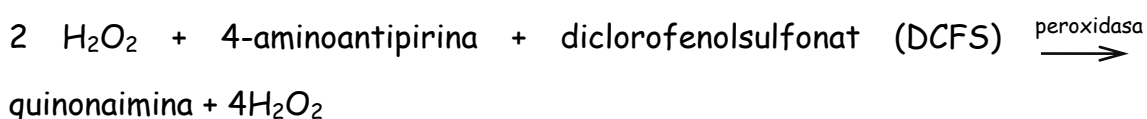
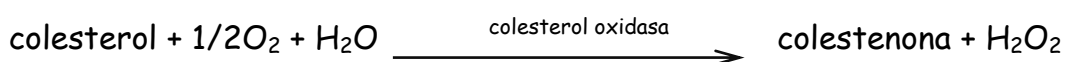
Sobre la fase aquosa-metanòlica, encara a dins de cada tub, s'hi van afegir 2.5 ml més de cloroform per a cada ml de suspensió inicial. Es va tornar a centrifugar a 300xg durant 15 minuts i es va tornar a succionar i filtrar la nova fase orgànica (2^{on} extracte lipídic). La darrera fase aquosa-metanòlica es descartà. Es van ajuntar els dos extractes lipídics, s'hi va passar nitrogen sec i es van guardar en un tub de vidre amb tap de rosca, proveït de junta de tefló, al congelador a -20°C per a les posteriors determinacions de colesterol i de fosfolípids.

3.2.6 Determinació de colesterol

Per a la determinació del colesterol no esterificat, contingut en els espermatozoides, es va utilitzar el *kit Colesterol HDL* de *BioSystems* (Barcelona) dissenyat per a anàlisi clínica de colesterol en plasma sanguini, amb algunes modificacions. El mètode, tal com és emprat en les anàlisis clíniques no és apte per a mostres d'extractes lipídics de membranes biològiques o de liposomes. Per aquesta raó es procedí a la modificació de l'esmentat mètode en el nostre laboratori. D'altra banda, el producte ens fou subministrat sense l'enzim colesterol esterasa, per tal d'excloure de les nostres mesures el colesterol que pogués procedir de la hidròlisi dels ésters de colesterol. A continuació es descriu el mètode tal com va quedar modificat.

3.2.6.1 Fonament del mètode

La quantificació espectrofotomètrica del colesterol es basa en les reaccions acoblades descrites a continuació (Allain i col. 1974):



La quinonaimina resultant dóna una coloració rosada amb un màxim d'absorció a 508 nm, fet que permet la determinació colorimètrica del colesterol.

3.2.6.2 Composició dels reactius en el kit original

Reactiu A : fosfats 35 mmol/L, colat sòdic 0.5 mmol/L, DCFS 4mmol/L, pH 7.0 (48 ml).

Reactiu B : colesterol oxidasa > 2 U/ml, peroxidasa > 20 U/ml, aminoantipirina 12.5 mmol/L (2 ml).

3.2.6.3 Composició dels reactius modificats

La composició dels reactius es va modificar de tal manera que quan s'afegissin els enzims, els lípids estiguessin ja ben resuspesos. És per això que en el Reactiu I s'hi inclou *TritonX-100*, detergent que facilita la resuspensió abans d'afegir els enzims que es troben en el Reactiu II.

Reactiu I : 0.5 ml Reactiu I / tub.

50 μ L Triton X-100 pur diluït 10 vegades / ml Reactiu A

Reactiu II: 0.5 ml Reactiu II/ tub

11.5 ml Reactiu A / ml Reactiu B

La mescla del Reactiu A amb el Reactiu B és estable 45 dies a 2-8°C.

3.2.6.4 Descripció del mètode

A cada tub de la recta patró, a part de la quantitat de colesterol que li corresponia, se li va afegir 185 μ g de fosfatidilcolina d'ou (EPC), dissolts en cloroform-metanol (1:1, v:v).

El dissolvent orgànic de les dissolucions patró així preparades, i dels extractes lipídics d'espermatozoides, (3.2.5), es va deixar evaporar sota corrent de nitrogen sec fins a sequedat. A continuació es va afegir 0.5 ml de Reactiu I a cada tub, es va agitar enèrgicament mitjançant un *vortex*, s'hi va afegir 0.5 ml de Reactiu II i es va escalfar cada tub a 37°C en un bany durant 7 minuts amb agitació. Passat aquest temps s'enregistrà immediatament l'espectre d'absorció entre 400 i 800 nm en un

espectrofotòmetre Perkin Elmer 320 (velocitat d'escombrat: 120 nm / min., temps de resposta: 2 s, esclatxa: 2 nm) i/o en un lector d'ELISA Anthos Labtec Instruments (filtre a 492 nm).

3.2.7 Determinació de fosfolípids

Per a la determinació de fosfolípids (PLs) es va utilitzar el mètode de Stewart (Stewart 1980).

3.2.7.1 Composició del reactiu

Reactiu de Stewart: 27.03 g/L de clorur fèrric
30.4 g/L de tiocianat amònic
(en aigua *miliQ*).

3.2.7.2 Fonament del mètode

El $\text{Fe}(\text{SCN})_3$ és soluble en la fase aquosa i insoluble en cloroform. En presència de fosfolípids, el reactiu forma complexos fosfolípid : $\text{Fe}(\text{SCN})_3$ d'estequiometria variable, segons el fosfolípid, entre 1:1 i 2:1. El complex format és poc soluble en la fase aquosa i molt soluble en la fase orgànica. Després de la separació de les fases, la fase orgànica presenta una coloració rogenca, amb un màxim d'absorció a 488 nm. Aquest mètode presenta diferent sensibilitat pels diversos tipus de fosfolípid, depenent del seu cap polar. Per exemple, el mètode detecta el 100% de la fosfatidilcolina, però no detecta el fosfatidilglicerol (Stewart 1980). Per tant, el mètode s'ha

utilitzat només per a detectar, en el seu cas, canvis en els nivells de fosfolípids totals.

D'altra banda, els avantatges d'aquest mètode respecte del mètode de Bartlett, basat en la determinació dels grups fosfat (Bartlett 1959), són la seva simplicitat, rapidesa, elevada precisió i el fet que la presència de fosfat inorgànic no interfereix.

3.2.7.3 Descripció del mètode

Per a cada experiment de determinació de fosfolípids (PLs) es va confeccionar una recta patró a partir de 7 dissolucions patró de DPPC que contenien entre 5 µg i 100 µg. El mètode de Stewart permet detectar fosfolípids fins i tot per sota de 5 µg (Stewart 1980). Es va obtenir compliment de la llei de Beer per l'esmentat interval amb rectes amb un coeficient de correlació > 0.99 en tots els casos i amb un pendent de $5.7 \times 10^{-3} \pm 3.5 \times 10^{-4}$.

El dissolvent orgànic dels extractes lipídics dels espermatozoides (3.2.5), que contenien unes 5×10^7 cèl·lules, es va evaporar sota corrent de nitrogen sec fins a sequedat. Es va comprovar que aquest pas és estrictament necessari; d'altra manera, el metanol residual introdueix distorsions en els resultats. Els residus secs es van resuspendre en 2 ml de cloroform pur i s'hi va afegir 2 ml del reactiu de Stewart. Donat que aquests dos components són immiscibles, es formaren dues fases. Per tal que el complex format pels PLs i el $\text{Fe}(\text{SCN})_3$ passés a la fase clorofòrmica, es va agitar vigorosament amb el *vortex* durant 30 s. A continuació es va retirar amb pipeta Pasteur la porció aquosa superior, reactiu de Stewart en

excés, per facilitar la posterior recuperació de la fase clorofòrmica. Tot seguit es va enregistrar l'espectre d'absorció al visible de les fases clorofòrmiques, en un espectrofotòmetre Perkin Elmer 320 (velocitat d'escombrat: 120 nm / min, temps de resposta: 2 s, esclatxa: 2 nm) i/o en un espectrofotòmetre Cary 3 Bio (velocitat d'escombrat: 250 nm / min, temps d'adquisició: 0.17 s / punt, esclatxa: 2 nm.) des de 420 nm fins a 740 nm. La contribució del *light scattering* s'obtenia per extrapolació del tram lineal de l'espectre, entre 700 nm i 740 nm i es restava de l'absorció en el màxim de l'espectre, a 488 nm, a fi d'obtenir lectures d'absorbància més acurades. Finalment es van interpolar els valors d'absorbància de les mostres a la recta patró per tal d'obtenir els micrograms de fosfolípid.

3.2.8 Preparació dels liposomes per als estudis de fluorescència

Es parteix d'una dissolució de lípids en dissolvent orgànic; en el cas de la DPPC, en cloroform, i en el cas dels extractes lipídics d'espermatozoide en cloroform-metanol (fase orgànica procedent de l'extracció lipídica, apartat 3.2.5). Un volum de dissolució de lípids en dissolvent orgànic que, o bé contingués 1 mg de DPPC o bé procedís de 600 milions d'espermatozoides (3.2.5), va ser assecat sota corrent de N₂ sec. El film sec resultant va ser mantingut en el liofilitzador durant una nit per tal d'eliminar-ne totalment el dissolvent i a continuació va ser resuspès en 2 ml de tampó TBS. La solució resultant es va mantenir en un bany, a una temperatura de 10°C per sobre de la temperatura de transició de fase (T_m) dels lípids, durant 1 hora. La temperatura del bany va ser de 55°C per a la DPPC i de 37°C pels lípids provinents d'espermatozoides. Durant aquest

temps, la mostra es treia del bany per agitar-la vigorosament amb un *vortex* durant 1 min cada 5 min. Donat que en el cas dels extractes lipídics l'agitació amb el *vortex* era insuficient per resuspendre els lípids, es va procedir a la sonicació de les mostres, en dos intervals de 15 segons al 30% de potència d'un sonicador Dynatech (Sonic Dismembrator) amb la sonda *Micro* de 3.4 mm de diàmetre. D'aquesta manera s'obtenen liposomes multilamel·lars (MLVs). Tots els passos es van dur a terme en tubs de vidre Pyrex amb tap de rosca proveït de junta de tefló (material resistent als dissolvents orgànics), a la foscor i havent-ne eliminat l'aire mitjançant corrent de N₂ sec, per tal de reduir la fotodegradació i l'oxidació dels lípids.

3.2.9 Preparació dels espermatozoides per als estudis de fluorescència

Els espermatozoides, control o tractats amb acceptors de colesterol, que havien de servir pels estudis de fluorescència amb cèl·lules senceres, es van preparar segons es descriu a l'apartat 3.2.3.3 (alíquota C).

3.2.10 Preparació dels espermatozoides per als estudis en el microscopi confocal

Els espermatozoides, control o tractats amb acceptors de colesterol, que havien de servir per als estudis en el microscopi confocal es van preparar segons es descriu a l'apartat 3.2.3.4 (alíquota D).

3.2.11 Preparació dels espermatozoides per als estudis de citometria de flux

Els espermatozoides, control o tractats amb acceptors de colesterol, que havien de servir per als estudis de citometria de flux es van preparar segons es descriu a l'apartat 3.2.3.5 (alíquota E).

3.3 Mètodes espectroscòpics

3.3.1 Anisotropia de fluorescència

3.3.1.1 *Fonaments teòrics de la tècnica*

La fluorescència és una de les tècniques espectroscòpiques més prometedores en biologia. Un dels avantatges d'aquesta tècnica és que es pot treballar amb mostres *in vivo* o *in vitro*, amb cèl·lules senceres, en condicions biològiques naturals. És un tècnica gairebé no invasiva, ja que les concentracions de les sondes amb les quals es treballa no es consideren tòxiques. Això és possible gràcies a la gran sensibilitat de la tècnica, amb la qual es pot treballar fins a una concentració de 10^{-12} o 10^{-11} M del fluoròfor, mentre que l'espectroscòpia d'absorció requereix un mínim de 10^{-8} M del cromòfor i la RMN, 10^{-5} M del nucli estudiat.

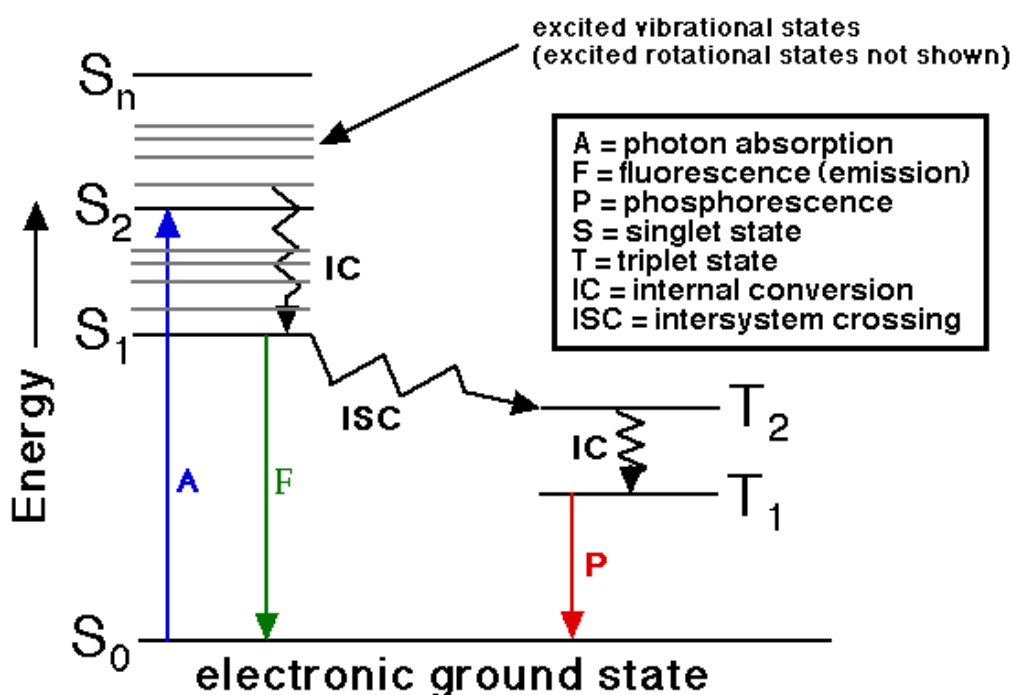


Figura 11 Diferents vies de relaxació d'una molècula excitada electrònicament per l'absorció de radiació electromagnètica. Les fletxes ondulades representen processos en els quals l'energia és perduda sense l'emissió de fotons; les fletxes en línia recta representen tant l'absorció com l'emissió de fotons.

L'espectroscòpia de fluorescència es basa en l'emissió de fotons com a resultat de la relaxació de molècules excitades prèviament amb radiació electromagnètica UV.

A temperatura ambient, la majoria de les molècules es troben en el nivell vibracional més baix de l'estat fonamental ($S_{0,0}$), i després de l'absorció de llum per part de la molècula poden tenir lloc diversos processos. En l'excitació inicial un fluoròfor és generalment excitat des de l'estat fonamental fins als diferents nivells vibracionals tant del primer com del segon estat electrònic excitat. Exceptuant rares ocasions, les molècules es relaxen fins a l'estat vibracional més baix del primer estat electrònic excitat ($S_{1,0}$), disipant-se l'energia corresponent en forma de calor. Aquest

procés de relaxació és anomenat conversió interna; té lloc en un temps d'aproximadament 10^{-12} segons i es completa abans de l'emissió fluorescent, de forma que després d'una excitació inicial i durant un temps molt curt s'obté una població de molècules que es troben en el nivell vibracional més baix del primer estat electrònic excitat ($S_{1,0}$). A partir d'aquí la relaxació fins a qualsevol dels nivells de l'estat fonamental ($S_{0,i}$) pot dur-se a terme mitjançant un procés radiatiu anomenat emissió fluorescent o fluorescència o mitjançant un procés no radiatiu que pot implicar diferents fenòmens com relaxació vibracional, *quenching*, relaxació pel solut, conversió interna, etc. Ambdós fenòmens, el radiatiu i el no radiatiu, competeixen ja que tenen lloc en un ordre de temps semblant (10^{-7} - 10^{-8} segons), de forma que es donarà l'un o l'altre depenent de les característiques moleculars, estructurals i intrínseques de cada molècula, les quals ens donaran les velocitats relatives de cada procés (Figura 11). Els salts energètics corresponents a l'emissió fluorescent són de més baixa energia que les transicions d'absorció, per això l'espectre d'emissió apareix a longituds d'ona més llargues que les de l'espectre d'absorció.

La transició d'un estat electrònic a un altre modifica la repartició de les càrregues elèctriques dins de la molècula. Aquest canvi és representat pel dipol elèctric de transició, que juga un paper essencial en el mecanisme d'absorció de fotons. Els fluoròfors absorbeixen preferentment els fotons que tenen els vectors elèctrics alineats paral·lelament al moment dipolar de transició del fluoròfor. Pel que fa a l'emissió de fluorescència hi ha també una dependència similar entre els dipols d'emissió de fluorescència i el vector elèctric de la llum emesa. Per aquestes raons si s'excita una molècula amb llum polaritzada s'espera que la fluorescència emesa també sigui

polaritzada. L'extensió de la polarització d'emissió pot ser mesurada per un segon polaritzador (Figura 12). Si aquest segon polaritzador es situa paral·lel al primer, la quantitat de llum detectada ha de ser màxima, i si és orientat perpendicularment al primer, la intensitat emesa ha de ser nul·la (Janin 1985).

Si anomenem O_x a la direcció de polarització de l'ona incident, la fluorescència emesa té una component d'intensitat $I_{//}$ al llarg de O_x i les components d'intensitat I_{\perp} al llarg de les direccions ortogonals O_y i O_z . La intensitat de fluorescència total és la suma de les components polaritzades en les 3 direccions:

$$I = I_{//} + 2I_{\perp}$$

La component paral·lela en general és més intensa. Si la diferència és:

$$D = I_{//} - I_{\perp}$$

l'anisotropia de fluorescència es defineix com:

$$r = \frac{D}{I} = \frac{I_{//} - I_{\perp}}{I_{//} + 2I_{\perp}}$$

Durant la mesura de les intensitats de fluorescència el polaritzador d'excitació es col·loca verticalment. Pel que fa al polaritzador d'emissió cal efectuar dues mesures, una amb el polaritzador vertical i una altra amb el polaritzador horitzontal (Figura 12). Així, l'anisotropia es pot expressar com:

$$r = \frac{I_{VV} - I_{VH}}{I_{VV} + 2I_{VH}}$$

on r representa l'anisotropia de fluorescència i I la intensitat de fluorescència, essent la primera lletra del subíndex la posició del polaritzador d'excitació i la segona la posició del polaritzador d'emissió; així V significa vertical i H horitzontal (Figura 12). En els fluorímetres anomenats "en forma L" les dues mesures de la intensitat emesa, I_{VV} i I_{VH} , s'efectuen una darrera l'altra. En canvi, en els fluorímetres anomenats "en forma T", com l'emprat en aquest treball, s'efectuen simultàniament, a través dels dos detectors que, situats a la dreta i a l'esquerra de la mostra, recullen l'emissió per fluorescència (Lakowicz 1983).

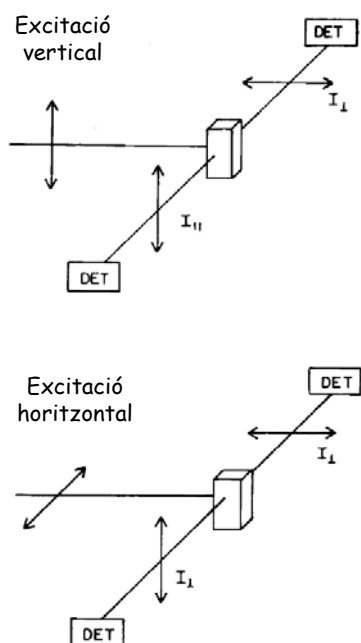


Figura 12 Diagrama esquemàtic d'un espectrofluorímetre en disposició T (Lakowicz 1983).

S'ha d'aplicar, però, als valors obtinguts, un factor de correcció o factor G que es determina a partir de les intensitats de fluorescència recollides quan el polaritzador d'excitació es troba en posició horitzontal:

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}}$$

Aquest factor G és definit com l'eficiència relativa de l'aparell per a la detecció de la radiació emesa segons si és polaritzada horitzontalment o verticalment. Aquesta correcció és necessària perquè els elements de l'òptica del fluorímetre (miralls, etc.) reflecteixen preferentment la llum polaritzada paral·lelament a la superfície reflexant i també perquè generalment les lents tenen transmissibilitats majors per un dels dos plans de polarització respecte de l'altre. Així, l'anisotropia corregida és:

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}}$$

L'aplicació més freqüent de la polarització de fluorescència en bioquímica aprofita la dependència que té l'anisotropia respecte de les característiques de l'entorn o medi on es troba el fluoròfor. Si una població de molècules amb orientacions distribuïdes a l'atzar, és excitada amb radiació polaritzada verticalment, la fracció de molècules que tingui el dipol d'absorció orientat verticalment presentarà excitació preferencial. D'aquesta manera es crea una població de molècules preferentment excitées, que tenen una orientació determinada i que romandran en l'estat excitat durant alguns nanosegons (temps de vida de l'estat excitat) fins que es produeixi l'emissió fluorescent. En la mesura en que durant aquest temps

es produeixi la difusió rotacional de les molècules excitades, es produirà també la despolarització de la fluorescència emesa.

Aquesta despolarització dependrà de la forma i mida de la sonda fluorescent i també de les característiques de fluïdesa del medi (vegeu Figura 13 i Figura 14). Si l'entorn de la sonda és molt rígid, no té lloc cap moviment de la molècula excitada durant la vida de l'estat excitat i l'anisotropia de fluorescència és igual a 1, el seu valor màxim possible assolible en els cristalls sòlids. Mentre que, si l'entorn és molt fluid, les molècules excitades assoliran novament una distribució d'orientacions aleatòries, l'emissió de fluorescència serà totalment despolaritzada, i l'anisotropia de fluorescència pot baixar fins a 0, com es donaria en la majoria de líquids.

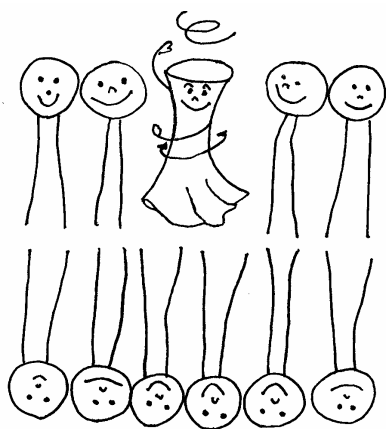


Figura 13 Moviment rotacional d'una sonda fluorescent incorporada dins d'una bicapa lipídica (Slavik 1994).

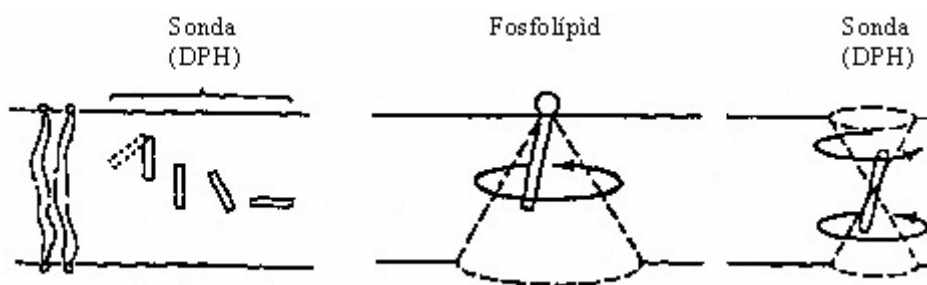


Figura 14 Comparació del moviment rotacional de la sonda DPH amb el dels fosfolípids (Hilderson 1988).

3.3.1.2 El fluoròfor

Les molècules que, per les seves característiques químiques estructurals, es desexciten emetent fluorescència, reben el nom de fluoròfors, que generalment són compostos que tenen electrons deslocalitzats presents en dobles enllaços conjugats. Cada fluoròfor es caracteritza per la seva longitud d'ona d'excitació i per la seva longitud d'ona d'emissió de la fluorescència.

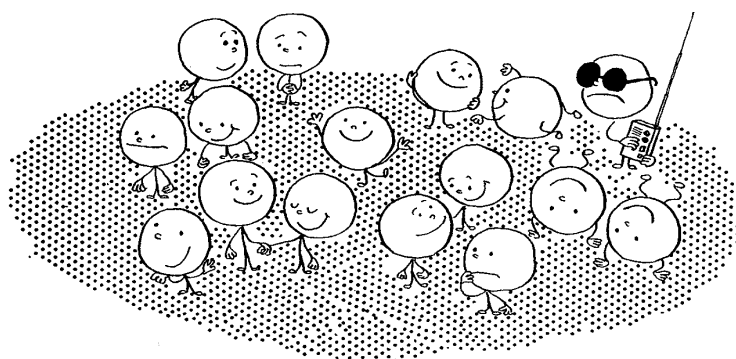


Figura 15 La sonda fluorescent representa un corresposal molecular en la mostra biològica (Slavik 1994).

La selecció d'un fluoròfor pels estudis en biomembranes no pot ser a l'atzar, sinó que dependrà de la zona de la membrana que estem interessats en estudiar (Figura 15). Si el nostre interès està en la regió de les cadenes

hidrocarbonades de la membrana hem de buscar una sonda hidrofòbica que tingui afinitat per un entorn apolar. El 1,6-difenil-1,3,5-hexatriè (DPH), la sonda fluorescent més àmpliament utilitzada per aquest tipus d'estudis, és la que hem utilitzat en el present treball (Figura 16). El DPH és una molècula soluble en dissolvents orgànics com el n-hexà o el tetrahidrofurà (THF), en els quals presenta un elevat coeficient d'extinció molar ($\epsilon = 80.000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) i elevada fluorescència, amb els màxims d'excitació i d'emissió a 355 nm i 425 nm respectivament en n-hexà, i a 367 nm i 431 nm respectivament en l'entorn hidrofòbic donat per la bicapa lipídica. Pot ser dispersat en medi aquós on forma agregats no fluorescents (Lakowicz 1999). Quan s'incorpora en la bicapa lipídica es localitza exclusivament en el seu interior hidrofòbic i la seva disposició no és selectiva: es distribueix per igual en els dominis en fase gel que en els dominis en fase cristall-líquid (vegeu Figura 17). També s'ha demostrat que la seva localització és similar tant en presència com en absència de colesterol. Això implica que els efectes induïts pel colesterol en la polarització de fluorescència del DPH reflecteixen diferències en el moviment del DPH i no pas en la seva localització (Kaiser i London 1998). Aquesta molècula interacciona mitjançant interaccions de van der Waals amb les cadenes acíliques del lípid esdevenint una part integral del sistema. El DPH, però, sofreix una fotoisomerització que li fa perdre gradualment la seva intensitat de fluorescència, al llarg del temps d'estar exposat a la llum.

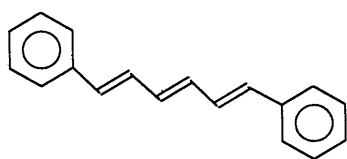
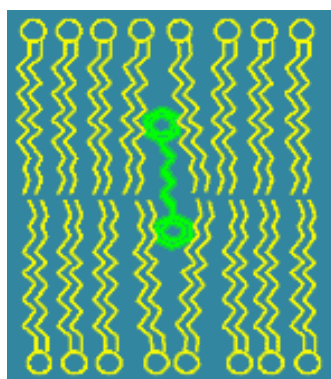
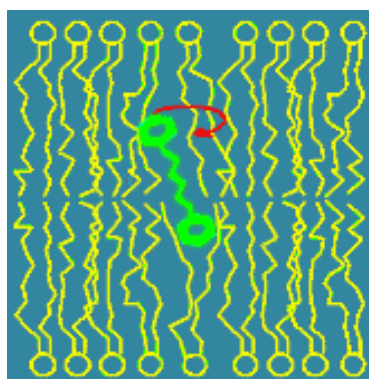


Figura 16 Estructura molecular del DPH (Shechter 1990).



Bicapa en fase gel



Bicapa en fase cristall-líquid

Figura 17 Localització del DPH en la bicapa lipídica.

3.3.1.3 *Microviscositat aparent*

L'anisotropia de fluorescència és una mesura que depèn de la microviscositat del medi on es troba el fluoròfor. La viscositat o microviscositat es defineix com la resistència que oposa un fluid, o en aquest cas, els lípids de la membrana, a ser desplaçats. La unitat de la viscositat en el sistema c.g.s és $\text{dina}\cdot\text{s}\cdot\text{cm}^{-2}$, la qual és definida com a Poise (P). Així, aquesta dependència permet utilitzar les mesures d'anisotropia de fluorescència com a estimació de la microviscositat de la regió de les cadenes acil·liques de les membranes cel·lulars. Cal remarcar, però, que la microviscositat no és una funció lineal de l'anisotropia. En algunes publicacions els autors (Cross 2003) converteixen l'anisotropia (r) de fluorescència en *microviscositat aparent* de la bicapa (ϕ) mitjançant la fórmula:

$$\phi = \left(\frac{r_0}{r} - 1 \right)^{-1}$$

on ϕ representa la "microviscositat aparent" i r_0 és el valor de d'anisotropia quan el fluoròfor està completament immobilitzat (0.362 pel DPH (Shinitzky i Barenholz 1978)).

La recíproca de la viscositat és el paràmetre de fluïdesa (η) (Lakowicz 1983):

$$\Phi = \frac{1}{\eta}$$

on η representa la fluïdesa i ϕ la microviscositat de la dispersió lipídica estudiada.

Però s'ha de considerar que l'anisotropia de fluorescència mesurada reflecteix més les propietats locals del microentorn que la resistència a la velocitat del flux macroscòpic (idea clàssica de viscositat). Per a fluids isotròpics la fluïdesa és definida com la inversa de la viscositat, però la relació no és tan clara ni directa per les microviscositats mesurades en bicapes lipídiques amb DPH. Aquí hi ha diversos moviments moleculars relacionats amb el paràmetre de fluïdesa, com són els moviments de les cadenes d'acil dels fosfolípids, els moviments de difusió lateral i rotacional dels lípids i de les proteïnes constituents de les membranes, etc. Per tots aquests motius, ens ha semblat millor de representar directament els valors d'anisotropia (r) mesurats experimentalment, com fan molts autors, i no pas la conversió al paràmetre de microviscositat o de fluïdesa.

3.3.1.4 *Descripció de l'aparell*

L'espectrofluorímetre SLM-Aminco 8100 del qual disposem a la Unitat de Biofísica, està proveït de tres detectors, un detector de referència, que enregistra la radiació d'excitació, i dos detectors d'emissió, situats l'un al canal de l'esquerra i l'altra al canal de la dreta de la mostra (vegeu un esquema a la Figura 12) i de dos monocromadors, un d'excitació i només un d'emissió. El monocromador d'emissió està intercalat entre el compartiment de la mostra i el detector de l'esquerra donant una configuració en forma L, que és la utilitzada normalment en la majoria dels experiments de fluorescència. Tanmateix, quan es volia treballar en forma T, pels estudis de polarització de fluorescència es va suprimir la funció del monocromador d'emissió i es van interposar uns filtres de tall que fessin la mateixa funció: deixar passar només la llum d'una determinada zona de longitud d'ona de l'espectre.

Un dels objectius metodològics del present treball va ésser l'adaptació de l'espectrofluorímetre SLM-Aminco 8100 del nostre laboratori, de manera que permetés l'adquisició automatitzada de les dades d'anisotropia de fluorescència.

Per aconseguir aquest objectiu es van introduir en l'equipament les següents modificacions:

- Un programa informàtic, dissenyat pel Dr. Joaquim Villaverde, de la Unitat de Biofísica, que permet sincronitzar l'adquisició de dades pel fluorímetre amb l'augment controlat de la temperatura de la mostra, a través d'un bany Haake d'estabilitat $\pm 0.05^{\circ}\text{C}$ i de precisió $\pm 0.01^{\circ}\text{C}$.

- Un motor de passos, dissenyat per Microbeam S. A. (Barcelona), que acciona el moviment del polaritzador d'excitació entre les seves posicions extremes vertical i horitzontal. Aquest moviment és controlat també pel programa abans esmentat, permetent així l'obtenció de les intensitats de fluorescència I_{VV} i I_{VH} de manera alternada amb les intensitats I_{HV} i I_{HH} .
- Una placa convertidora analògic-digital (AD/DA) de 14 *bytes* per a la comunicació entre l'ordinador del fluorímetre i el bany Haake.

L'aparell així configurat va ésser sotmès a diversos controls conduents a la seva optimització per a l'adquisició automàtica de les dades d'anisotropia de fluorescència. Els resultats d'aquests controls es descriuen a l'apartat de resultats 4.2.1.

3.3.1.5 *Marcatge de la mostra amb la sonda fluorescent (DPH)*

En els estudis de fluorescència, la mostra contenia 3×10^7 espermatozoides / ml de tampó TBS, si es treballava amb cèl·lules senceres (3.2.9), o bé 0.3 mg de fosfolípids / ml de tampó TBS, si es treballava amb liposomes de DPPC pura, o bé els lípids provinents d'extractes de 6×10^8 espermatozoides (3.2.8).

El tub que contenia la mostra es va introduir en un petit bany termostàtic proveït d'agitació magnètica, i es va deixar establir a una temperatura de 10°C per sobre de la T_m dels fosfolípids: 37°C pels espermatozoides i pels liposomes de lípids provinents d'espermatozoide i 50°C pels liposomes de DPPC. Amb una xeringa Hamilton es va afegir $5 \mu\text{L}$ de dissolució de la sonda DPH (0.17 mg DPH / ml de tetrahidrofurà (THF))

a la suspensió, tot augmentant momentàniament l'agitació. No convé afegir volums de THF superiors a 5 μL pel seu probable efecte sobre la fluïdesa de membrana. El tub es va deixar destapat durant uns minuts per facilitar l'evaporació del THF, es va tancar i es va deixar durant 30 minuts a la foscor i en agitació contínua. D'aquesta manera s'assegurava la incorporació total i uniforme de la sonda, en equilibri amb els lípids components de les membranes i, per tant, l'estabilització de la fluorescència emesa. Les mostres varen ser utilitzades pels estudis d'anisotropia immediatament després de la seva preparació.

3.3.1.6 Adquisició de les dades

Les mostres, ja marcades, van ser transferides a una cubeta de quars d'1 ml, la qual va ser introduïda dins del portacubetes termostatitzat del fluorímetre, equipat amb un agitador magnètic. El compartiment de la mostra es va mantenir sota corrent d'aire sec mentre la temperatura era inferior a la temperatura ambient. La temperatura del portamostres va ser controlada automàticament mitjançant un bany Haake amb una precisió de $\pm 0.01^\circ\text{C}$. Per a cada mesura o punt es va adquirir, de manera automatitzada i a la vegada, l'emissió de fluorescència durant 30 segons tant pel fotomultiplicador de l'esquerra com pel de la dreta (3.3.1.4). Es van obtenir 100 punts per a cada experiment, a temperatures creixents en l'interval comprès entre 4°C i 65°C a la velocitat de $80^\circ\text{C}/\text{hora}$.

El voltatge dels fotomultiplicadors es va establir, en cada cas, depenent de la configuració del fluorímetre, dels filtres presents i de si es treballava amb cèl·lules senceres o bé amb liposomes; en tots els casos,

però, es va igualar el nombre de comptes (nombre de fotons enregistrats pel detector) dels tres detectors per tal que les seves condicions de fotomultipliació fossin el més semblants possible.

Gràcies a un programa realitzat per en Juan Maria Sánchez s'obtenia directament la mitjana i la desviació estàndard de totes les adquisicions enregistrades automàticament a cada temperatura.

3.3.1.6.a Espectres d'excitació

S'utilitzava el fluorímetre en la seva configuració en forma L amb els dos monocromadors, el d'excitació i el d'emissió. Els espectres d'excitació s'obtingueren entre 300 i 400 nm mentre que l'emissió es va recollir a 430 nm. Les esclatxes utilitzades varen ser de 2 nm i 4 nm pel canal d'excitació i de 8 nm i 8 nm pel canal d'emissió.

3.3.1.6.b Espectres d'emissió

S'utilitzava també el fluorímetre en la configuració L, amb els seus dos monocromadors. La sonda es va excitar a 360 nm i els espectres d'emissió s'obtingueren entre 390 i 500 nm. Les esclatxes utilitzades pels espectres d'emissió varen ser les mateixes que pels d'excitació.

3.3.1.6.c Anisotropia

En els estudis d'anisotropia de fluorescència la sonda també va ser excitada a 360 nm, les esclatxes del monocromador d'excitació van ser també de 2 nm i 4 nm, però els discs seleccionadors de les esclatxes del monocromador d'emissió es van col·locar en la posició "zero", que correspon

a la màxima obertura. Així s'aconseguia que les condicions del detector de l'esquerra fossin el més semblants possible a les del de la dreta, desproveït de monocromador. A més a més, per tal de suprimir la funció del monocromador d'emissió pel canal de l'esquerra, a l'hora d'introduir en el *software* la λ a monocromar, s'introduïa el valor 0. D'aquesta manera, el monocromador deixa passar la totalitat de la radiació emesa que li arriba, independentment de la λ . L'interval de λ de la radiació emesa es va seleccionar mitjançant filtres, un per a cada detector d'emissió. El filtre considerat com a òptim (vegeu apartat 4.2.1.4) va ser el filtre *cut off* de gelatina 2B de la marca Kodak, que a partir de 390 nm deixa passar tota la llum. Aquest filtre té un 0% de transmissió a 360 nm i un 75% a 430 nm, és a dir, no permet el pas de radiació d'excitació mitjançant *scattering* i presenta una elevada transmissió al màxim d'emissió del fluoròfor.

3.3.1.7 Corbes de transició de fase

Un cop obtingut el valor de l'anisotropia de fluorescència, segons la fórmula descrita en l'apartat 3.3.1.1, es representa en funció de la temperatura. En el cas de mostres fosfolipídiques el resultat és una corba de transició de fase gel a fase cristall-líquid, la qual reflecteix la disminució de la microviscositat, o l'augment de fluïdesa de la bicapa lipídica, en augmentar la temperatura. La disminució de l'anisotropia (r) de fluorescència en augmentar la temperatura revela l'augment de la velocitat de difusió rotacional del fluoròfor en trobar-se aquest en un medi més fluid, amb les cadenes hidrocarbonades més desordenades en augmentar la temperatura. Les corbes de transició de fase, obtingudes per polarització

de fluorescència, donen informació de diferents paràmetres: el punt mig de la transició termotròpica (T_m), els valors asimptòtics inicial i final de cada transició i l'amplada de la transició (que correspon a l'entalpia de van't Hoff (ΔH_{vH})) ja sigui d'un sol lípid, d'un extracte biològic, així com de cèl·lules senceres. L'estimació d'aquests paràmetres permet estudiar l'estat biològic de les biomembranes, ja que es corresponen amb canvis de les propietats físiques de les bicapes lipídiques i de les membranes de les cèl·lules senceres (vegeu la introducció, apartat 1.7.5).

3.4 Marcatge selectiu de dominis lipídics de les membranes de l'espermatozoide. Microscòpia confocal

3.4.1 Fonaments teòrics de la tècnica

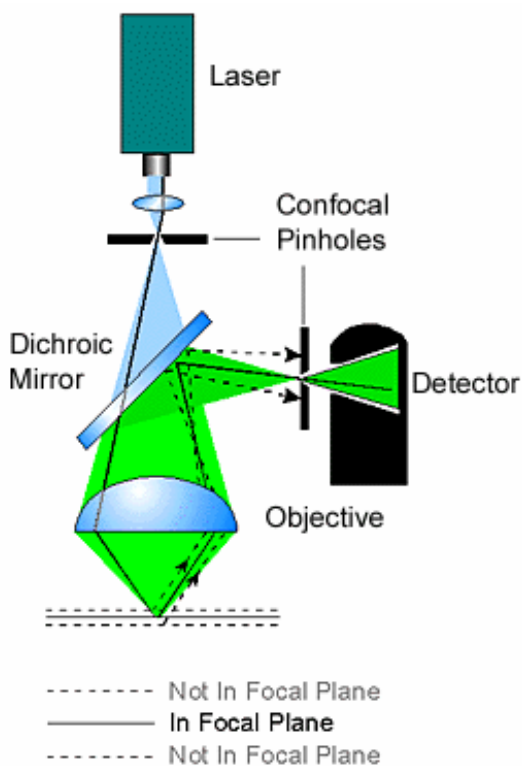


Figura 18 Esquema del funcionament d'un microscopi òptic confocal.

La microscòpia confocal ofereix, en molts casos, nombrosos avantatges respecte a la microscòpia òptica convencional. A diferència d'aquesta última, la radiació fluorescent que està fora de focus incrementa el contrast i de la resolució (Figura 18).

El feix de llum provinent del làser passa a través d'una obertura

(*illuminating pinhole*) i és dirigit cap a la mostra. Els fotodetectors (o fotomultiplicadors) recullen la llum fluorescent emesa (o la llum reflectida) per la mostra, que passa a través d'una petita obertura situada davant dels fotomultiplicadors. Aquesta obertura o diafragma (*confocal pinhole, detection pinhole*) discrimina la llum de fora del focus evitant que aquesta sigui captada pels fotodetectors. El resultat és l'obtenció d'una imatge o secció òptica confocal, ja sigui en el pla xy o xz. Es poden obtenir seccions òptiques, no destructives, a diferents plans de la mostra, és a dir, informació tridimensional. Les imatges són sempre digitals: els fotodetectors converteixen el senyal lumínic en un senyal elèctric, que en un sistema informàtic es tradueix en un pixel. La imatge es va formant punt per punt en la direcció de rastreig adoptada (*scanning*). Cada pixel té la informació de la seva posició en l'espai i un valor de 0 a 255, que correspon a l'escala de grisos utilitzada per a representar les diferents intensitats lumíniques captades.

3.4.1.1 Marcatge amb merocianina 540 (MC 540)

La Merocianina 540 (àcid 5-((3-sulfopropil-2(3H)-benzoxazolidin)-2-butenilidin)-1,2-dibutil-2-tiobarbitúric) (MC 540) és un fluoròfor carregat negativament i amb un pes molecular de 570 Daltons (vegeu Figura 19). A concentracions d'aproximadament 1 µg/ml en aigua, aquesta sonda absorbeix amb un màxim de 533 nm i emet amb un màxim de 572 nm (Dixit i Mackay 1983). La MC 540, en solució aquosa, es degrada molt ràpidament en presència de llum.

Degut a la localització de la seva càrrega negativa, la MC 540 no penetra fàcilment en cèl·lules intactes. Conseqüentment, el seu marcatge és, almenys inicialment, limitat a la cara externa de la bicapa lipídica de la membrana plasmàtica. Les seves propietats òptiques depenen fortament de l'entorn on està situada la sonda.

La merocianina 540 exhibeix una resposta cinètica bifàsica als canvis de polarització de membrana. S'uneix a la superfície de les membranes polaritzades amb una orientació perpendicular, formant dímers no fluorescents amb un espectre d'absorció alterat (Dragsten i Webb 1978; Verkman i Frosch 1985). Aquesta ràpida reorientació (de l'ordre de microsegons) és seguida per una resposta més lenta causada per una major incorporació de la sonda.

Encara que la MC 540 va estar entre els primers fluoròfors utilitzats com a sondes de potencial de membrana, el seu ús per a aquesta aplicació es va deixar estar amb l'aparició de sondes molt millors. Actualment la MC 540 és utilitzada sobretot com a sonda per mesurar l'empaquetament dels lípids, perquè s'insereix preferencialment en bicapes en les quals els fosfolípids estan fortament espaiats, és a dir, en bicapes en fase fluïda (Williamson i col. 1983; Stillwell i col. 1993). La fluorescència de la MC 540 és sensible a canvis induïts per la temperatura en l'organització dels lípids de membrana (Kumar i col. 1990). Humphries i Lovejoy van suggerir que la MC 540 s'uneix preferencialment a dominis lipídics lliures de colesterol (Humphries i Lovejoy 1983).

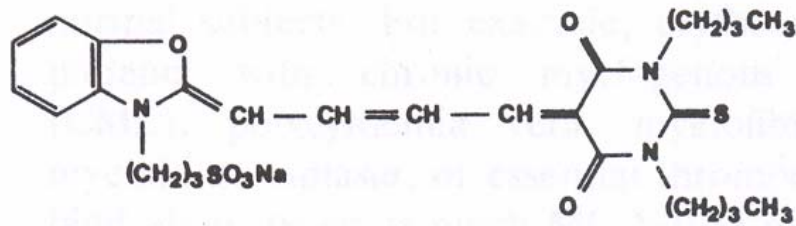


Figura 19 Estructura de la sonda MC 540 (Sieber 1987).

3.4.1.1.a Control de la viabilitat dels espermatozoides marcats amb MC 540

Per tal de distingir els espermatozoides vius dels morts en els experiments de microscòpia confocal, es va utilitzar un marcador de vitalitat cel·lular, el Yo-Pro-1 (4-[(3-metil-2(3H)-benzoxazolilidin) metil]-1-[3-(trimetilamoni)propil]-, diodur) (vegeu Figura 20). Aquesta sonda és una cianina monomèrica que permet la detecció de la doble hèlix de l'ADN. És una sonda que no pot travessar les membranes de les cèl·lules viues i, per tant, és un marcador efectiu de les cèl·lules mortes. És ideal per treballar amb microscòpia de fluorescència i amb citometria de flux. Ja ha estat utilitzada per diferents autors per treballar amb aquestes tècniques i amb espermatozoides de porc (Harrison i col. 1996; Flesch i col. 1999; Gadella i Harrison 2000; Flesch i col. 2001).

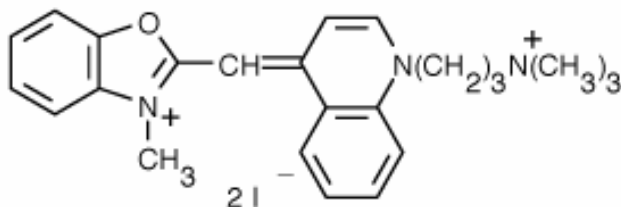


Figura 20 Estructura del Yo-Pro-1.

3.4.1.1.b Preparació de les mostres per a la microscòpia confocal

Als 490 μL de la suspensió d'espermatozoides en M-199 sense vermell de fenol (vegeu 3.2.3.4), que contenien unes 15×10^6 cèl·lules control (vegeu 3.2.2) o bé tractades amb β -ciclodextrina (βCD) (vegeu 3.2.3) se'ls va afegir 5 μL d'una dissolució de MC 540 100 μM i 5 μL d'una dissolució de Yo-Pro-1 2.5 μM , quedant a la concentració final de 1 μM i 25 nM, respectivament. La suspensió resultant es va mantenir a l'estufa a 37°C durant 10 minuts, per facilitar la incorporació dels marcadors a les membranes dels espermatozoides. Durant aquesta preparació s'evitava l'acció de la llum sobre la mostra, per impedir la fotodegradació de la MC 540.

3.4.1.1.c Visualització de la fluorescència de la MC 540

Per a cada observació al microscopi confocal s'utilitzaven 5 μL de l'esmentada suspensió d'espermatozoides (vegeu 3.2.3.4), col·locats a sobre d'un portaobjectes i coberts amb un cobreobjectes que es segellava amb esmalt d'ungles. Es col·locava una gota de medi de muntatge DPX a sobre del cobreobjectes per tal de captar les imatges digitals a través dels objectius d'immersió de 63 augments o bé amb el de 100x si es volia una cèl·lula amb detall. El microscopi utilitzat va ser un microscopi òptic làser confocal Leica TCS 4D (Leica, Heidelberg, Alemanya) equipat d'un làser d'argó-criptó. Els filtres d'excitació van ser de 488 nm pel Yo-Pro-1 i de 568 nm per la MC 540 i els d'emissió de 515 nm i de 590 nm, respectivament.

Al ser la MC 540 molt sensible a la llum, no es podia irradiar una cèl·lula el temps suficient per a observar-la, sinó que s'irradiava només el

temps suficient per a captar-ne la seva imatge. Degut a aquesta ràpida fotodegradació de la MC 540 totes les manipulacions es feien a les fosques.

3.4.1.1.d Tractament dels resultats

Un cop obtingudes les imatges digitals es va passar a l'anàlisi individual de cada espermatozoide amb el programa de tractament d'imatges, Scion Image per a Windows 98, versió 4.02 (accessible a la pàgina web: <http://www.scioncorp.com>). Per tal de poder visualitzar millor les diferències d'intensitat en un mateix espermatozoide es canviava el color original de la imatge per l'escala de colors Fire-2, que proporciona el mateix programa, i que permetia discriminar entre diferències petites d'intensitat.

L'esmentat programa permet seleccionar automàticament àrees d'intensitat de marcatge homogènies. Normalment aquestes àrees coincidien amb zones fisiològiques descrites en l'espermatozoide (vegeu introducció, apartat 1.7.2). Tanmateix la selecció automàtica podia ser corregida manualment en cas que les zones fisiològiques no quedessin ben delimitades.

Per tal de calcular la intensitat mitjana de la selecció s'havia d'establir un llindar o "threshold". Tots els pixels a partir del llindar seleccionat apareixien a la pantalla en negre, mentre que la resta eren en blanc. Així, es va calcular la intensitat mitjana per a cada zona de l'espermatozoide (vegeu Figura 3): zona apical, zona pre-equatorial, segment equatorial, postacrosoma, anell posterior, peça intermèdia i cua. Per tal de poder comparar les intensitats obtingudes en diferents imatges es van haver de normalitzar; amb aquest fi, es va decidir prendre com a

zona de referència la intensitat mitjana de la zona amb menys variabilitat, que era el postacrosoma. D'aquesta manera, el possible efecte del temps d'exposició de la sonda durant la captació de la imatge, quedava també normalitzat. Utilitzant la relació numèrica entre les intensitats normalitzades de les 7 zones de l'espermatozoide es van establir el que anomenem "patrons de marcatge" (vegeu resultats 4.3 i Figura 51).

3.5 Distribució poblacional de la fluïdesa de membrana: estudis per citometria de flux

3.5.1 Fonaments teòrics de la tècnica

La citometria de flux permet l'estudi precís de cèl·lules isolades que es troben en suspensió dins d'un líquid. Qualsevol partícula o cèl·lula suspesa, de dimensions compreses entre 0.2 i 150 μm , pot ser analitzada. Les cèl·lules de teixit sòlid, òbviament, s'han de disgregar abans d'introduir-les en el citòmetre. Les cèl·lules, alineades unes darrere les altres i separades per almenys 1 mm, desfilen a gran velocitat (a més de 8 m/s) per davant d'una font lluminosa, el més sovint un làser. La difusió lluminosa dóna informació sobre la mida i la rugositat de cadascuna de les cèl·lules. La font lluminosa també permet l'excitació de molècules fluorescents presents a la cèl·lula. Així doncs, el passatge de cèl·lules dins d'un citòmetre és, normalment, precedit d'una etapa de marcatge d'aquestes cèl·lules per una o més molècules, sondes o anticossos, específiques per a una estructura o per a una funció cel·lular, susceptibles d'emetre fluorescència després d'ésser excitades a una longitud d'ona concreta. La llum dispersada i la llum

fluorescent són recollides per unes lents col·locades apropiadament. La combinació de finestres i de filtres dirigeix la llum dispersada i la llum fluorescent cap als detectors o fotomultiplicadors apropiats. Els detectors produeixen senyals electrònics proporcionals als senyals òptics arribats. Així, cada cèl·lula és transformada en un "esdeveniment elèctric" (*event*) amb diverses coordenades (mida, rugositat, fluorescència 1, fluorescència 2, ...). El conjunt d'aquests esdeveniments forma un núvol de punts o citograma en el qual es poden dibuixar finestres electròniques (*gating*) per tal de seleccionar-ne uns de concrets i de rebutjar-ne uns altres (cèl·lules vives i mortes, per exemple), és a dir, per tal d'estudiar subpoblacions.

El citòmetre de flux consta de tres sistemes: el sistema de fluids, el sistema òptic i el sistema electrònic:

- El sistema de fluids és l'encarregat de transportar les partícules en flux laminar cap als feixos de llum (Figura 21).
- El sistema òptic consisteix en làsers per il·luminar les partícules i en filtres òptics per tal de direccionar els senyals de llum resultants cap als detectors apropiats (Figura 22).
- El sistema electrònic converteix els senyals de llum detectats en senyals electrònics que poden ser processats per l'ordinador.

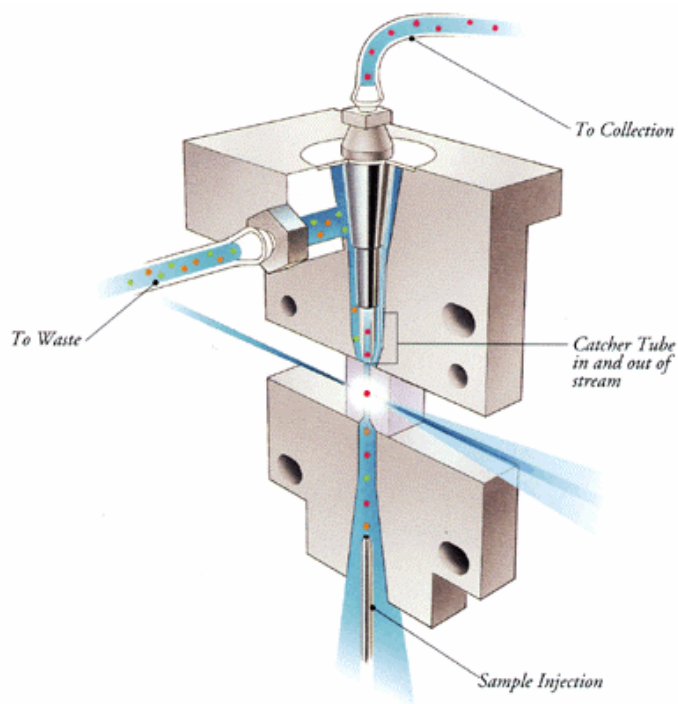


Figura 21 Sistema de fluids en un citòmetre de flux.

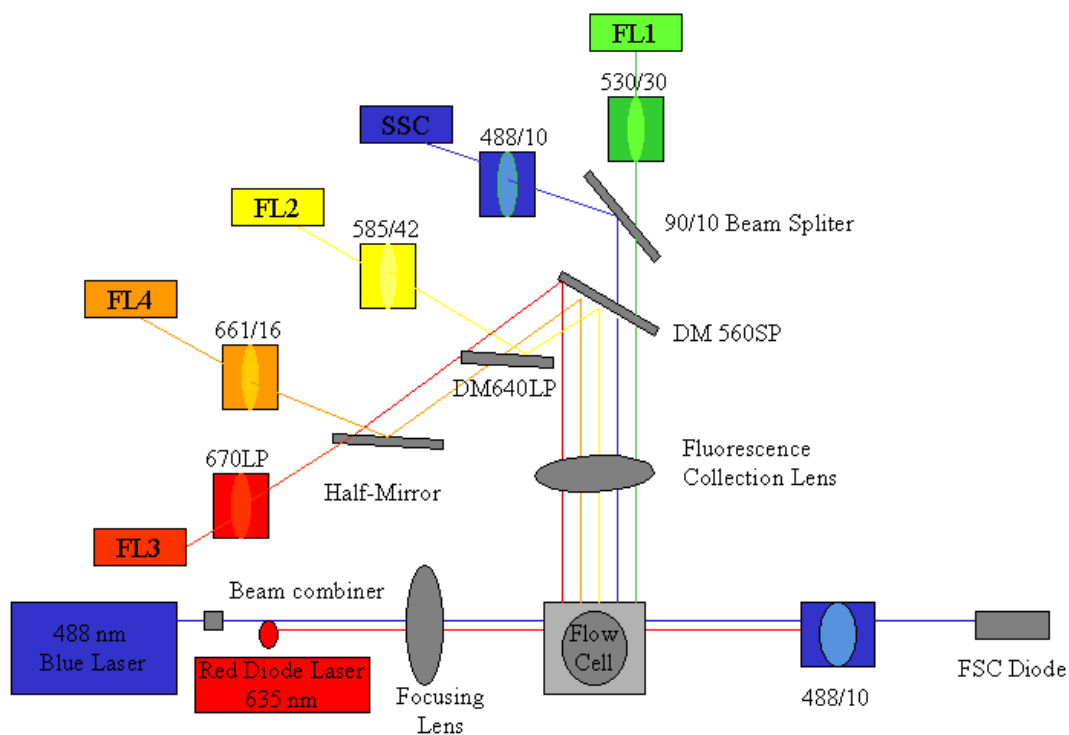


Figura 22 Esquema del sistema òptic en un citòmetre de flux.

La dispersió de la llum té lloc quan una partícula desvia un raig de llum incident. Aquesta dispersió depèn de les propietats físiques de la partícula, és a dir, de la seva mida i de la seva complexitat interna. Els factors que afecten la dispersió de la llum són, la membrana cel·lular, el nucli, i qualsevol material granular contingut dins de la cèl·lula. La forma i la topografia de la superfície de la cèl·lula també contribueixen al total de llum dispersada.

La *Forward-scattered light* (FSC) és proporcional a l'àrea de la superfície o a les dimensions de la cèl·lula. La FSC és una mesura de la llum difractada i és detectada en la mateixa direcció que el raig de llum incident, per un fotodiode (vegeu Figura 22 i Figura 23). La FSC és molt útil per a excloure partícules massa petites o bé massa grans, com els agregats cel·lulars, que podrien modificar els resultats.

La *Side-scattered light* (SSC) és proporcional a la granulositat de la cèl·lula o a la complexitat interna. La SSC és una mesura de la llum refractada i reflexada que té lloc a qualsevol interfície, per comportar un canvi d'índex de refracció. La SSC és recollida aproximadament a 90° respecte a la direcció del raig de llum incident mitjançant una lent adequada gràcies i redirigida al detector per un *beam splitter* (vegeu Figura 22 i Figura 23).

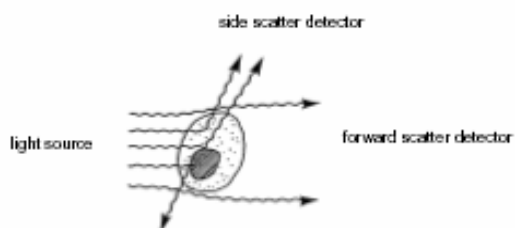


Figura 23 Tipus de dispersió de la llum, en funció de les propietats físiques de les cèl·lules.

La correlació de les mesures de FSC i SSC permet diferenciar tipus cel·lulars en una població heterogènia.

3.5.1.1 Preparació de les mostres per a la citometria de flux

Als 490 μL de la suspensió d'espermatozoides en M-199 sense vermell de fenol (vegeu 3.2.3.5), que contenien unes 5×10^6 cèl·lules control (vegeu 3.2.2) o bé tractades amb β -ciclodextrina (βCD) (vegeu 3.2.3) se'ls va afegir 5 μL d'una dissolució de MC 540 100 μM i 5 μL d'una dissolució de Yo-Pro-1 2.5 μM (colorant per a determinar la vitalitat de les cèl·lules), quedant a la concentració final de 1 μM i 25 nM, respectivament. La suspensió resultant es va mantenir a l'estufa a 37°C durant 10 minuts, per facilitar la incorporació dels marcadors a les membranes dels espermatozoides. Durant aquestes manipulacions s'evitava l'acció de la llum sobre les mostres per impedir la fotodegradació de la MC 540.

Transcorregut aquest temps es passava la mostra per un citòmetre de flux FACScalibur de Becton Dickinson equipat amb un emissor làser d'argó de 15 mW de potència que emet llum a 488 nm, la qual pot excitar més d'un fluoròfor. Tant la MC 540 com el Yo-Pro-1 s'excitaven a la mateixa longitud d'ona, és a dir, a 488 nm. La llum emesa era recollida per dos canals, FL1 pel Yo-Pro-1 i FL2 per la MC 540 equipats amb filtres de tall a 530 ± 30 nm i a 585 ± 42 nm respectivament. Els espermatozoides es van analitzar a una velocitat d'entre 300 i 600 "events" per segon. Tant l'adquisició com l'anàlisi de les dades es va fer amb el programa CellQuest (Becton Dickinson). Per a cada esdeveniment o cèl·lula es recollia informació sobre

la seva mida (FSC) i la seva rugositat (SSC) que es representava posteriorment de forma lineal, mentre que tant les fluorescències de la MC 540 com les del Yo-Pro-1 eren representades en mode logarítmic. Per a les mesures de mida el voltatge seleccionat va ésser l'escala E00, que multiplica el senyal FSC per 1, mentre que per la resta de paràmetres els voltatges es van ajustar de tal manera que la població sortís íntegrament a la pantalla. En la representació de la fluorescència del Yo-Pro-1 (FL1) enfront de la mida (FSC) es va fer una selecció de les cèl·lules vives (cèl·lules que no presentaven marcatge pel Yo-Pro-1) dibuixant una finestra a sobre del gràfic. Es van analitzar 20.000 cèl·lules vives per mostra. D'aquesta manera també s'eliminaven esdeveniments estranys, soroll, cèl·lules agregades i restes cel·lulars. Totes les posteriors anàlisis es van fer utilitzant només aquestes cèl·lules vives. Els voltatges per les fluorescències FL1 i FL2 es van haver de compensar, és a dir, les cèl·lules només marcades pel Yo-Pro-1 no podien donar fluorescència per FL2 ni les cèl·lules marcades només amb MC 540 podien donar senyal per FL1. Les mostres es van mantenir en l'incubador a 37°C, just fins el moment d'introduir-les en el citòmetre. Al mateix temps també s'evitava l'acció de la llum ambiental sobre la MC 540 tot protegint els tubs amb paper d'alumini.

3.6 Anàlisis estadístiques

3.6.1 Anàlisi estadística del contingut de colesterol i del percentatge de reacció acrosòmica

El contingut de colesterol i el percentatge de reacció acrosòmica es presenten com a mitjana \pm SEM. Les anàlisis estadístiques es van dur a terme mitjançant el programa SPSS per a Windows (versió 7.5.2S, SPSS Inc. Chicago, IL; 1997). L'anàlisi de la variança es va fer mitjançant la tècnica ANOVA (ANalysis Of VAriance). Els mètodes a posteriori utilitzats van ser el mètode de Gabriel per comparar les mitjanes entre diferents mostres i el mètode de Dunnett per comparar cada mostra amb el seu control. Les diferències significatives s'indiquen per $p < 0.05$ o $p < 0.01$.

3.6.2 Anàlisi estadística dels resultats d'anisotropia de fluorescència

Els resultats d'anisotropia de fluorescència es presenten com a mitjana \pm SEM. Les comparacions de cada paràmetre entre espermatozoides control i tractats es van analitzar estadísticament mitjançant el test *t-Student* i les diferències significatives s'indiquen per $p < 0.05$, $p < 0.01$ o $p < 0.001$.

3.6.3 Anàlisi estadística dels resultats obtinguts per microscòpia confocal

El tractament estadístic de les intensitats de fluorescència obtingudes al tractar les imatges digitals de microscòpia confocal, es va fer utilitzant el test de Bonferroni mitjançant el programa estadístic SPSS, versió 11.0 (accessible des de qualsevol ordinador de la UAB connectat al Servei 2002). Les diferències significatives s'indiquen per $p < 0.05$, $p < 0.01$ o $p < 0.001$.

També es va estudiar l'homogeneïtat de la distribució de patrons, en funció del tractament, mitjançant una prova khi quadrat (χ^2) i, de cadascun dels patrons, aplicant una correcció per multiplicitat de contrastos de Bonferroni.

3.6.4 Anàlisi estadística dels resultats obtinguts per citometria de flux

El tractament estadístic de les intensitats relatives de fluorescència (β CD/control, a diferents temps) obtingudes per citometria de flux es va fer utilitzant el test de Bonferroni mitjançant el programa estadístic SPSS, versió 11.0. Les diferències significatives s'indiquen per $p < 0.05$.

4 RESULTATS

4.1 Conseqüències de l'eliminació de colesterol de les membranes dels espermatozoides

4.1.1 Contingut de colesterol i de fosfolípids en els espermatozoides intactes

De cadascuna de les mostres a estudiar, se'n va reservar una alíquota per tal de determinar-ne el contingut de colesterol (Col) i de fosfolípids (PL) en espermatozoides intactes. Els resultats obtinguts foren els següents: el contingut de colesterol no esterificat va ésser de $8.2 \pm 0.5 \mu\text{g} / 10^8$ espermatozoides (mitjana \pm SEM, $n = 6$) i el de fosfolípids totals va ésser de $4.6 \pm 0.2 \mu\text{g} / 10^7$ espermatozoides (mitjana \pm SEM, $n = 6$). La relació Col/PL és de 0.18 (pes/pes), corresponent a 0.32 (mol/mol) (càlculs basats en un pes molecular mitjà dels fosfolípids de $700 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$).

4.1.2 Efecte de la BSA

Un dels objectius d'aquest treball era modificar, controladament, el contingut de colesterol en les membranes dels espermatozoides, i estudiar la possible repercussió d'aquest canvi sobre la capacitació i la reacció acrosòmica (vegeu l'apartat d'objectius, 2). Amb aquest fi es va utilitzar, inicialment, albúmina sèrica bovina (BSA), ja que és reconeguda com un bon acceptor de colesterol (Bartholow i Geyer 1981).

4.1.2.1 Contingut de colesterol i percentatge de reacció acrosòmica (RA) en espermatozoides tractats amb BSA.

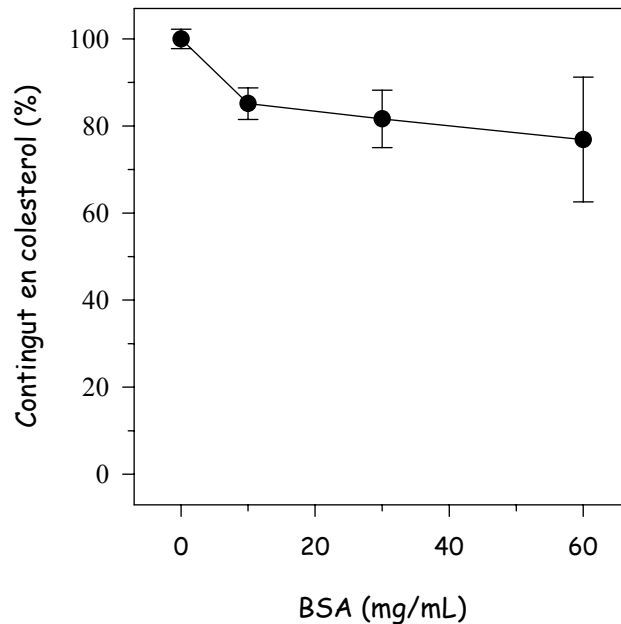


Figura 24 Percentatge de colesterol no esterificat en espermatozoides tractats amb diferents concentracions de BSA durant 120 minuts. Els valors expressats són mitjanes \pm SEM (n= 4).

Els espermatozoides es van incubar durant 120 minuts en presència de diferents concentracions d'albumina sèrica bovina (BSA) com a acceptor de colesterol. El fet més important a destacar en aquest estudi va ser la molt baixa reproductibilitat (vegeu Figura 24), fet, per si sol, suficient per descartar aquesta estratègia experimental. D'altra banda, el valor mitjà de l'eliminació de colesterol obtingut va ser només del 20%, valor insuficient si es tenen en compte els precedents bibliogràfics, situats entre el 30% i el 59% (Go i Wolf 1985; Langlais i col. 1988). A continuació es va provar una

Resultats

altra albúmina, l'albúmina sèrica humana (HSA), la qual va donar resultats similars als de la BSA. Pel que fa a la RA, els resultats van presentar la mateixa manca de reproductibilitat que la sortida de colesterol. Mentre que en algun cas es va obtenir nivells de RA de l'ordre del 25%, en altres no s'obtenia RA significativa.

Per tal d'obtenir una possible explicació de la baixa reproductibilitat dels resultats i també de la poca eficiència d'aquestes albúmines se'n va comprovar el percentatge de contaminació per colesterol. Els resultats es mostren a la Taula 3. En cap cas es va arribar a l'1% molar de contaminació, fet que, per tant, no explicaria cap dels dos problemes abans esmentats.

Tipus d'albúmina	mols Col / 100 mols albúmina
Bovine Serum Albumin (BSA)	0.09 ± 0.03
BSA Lot 14593820-21	0.24 ± 0.01
Human Serum Albumin (HSA) Lot 115H9382	0.45 ± 0.26
HSA Lot 116F9363	0.56 ± 0.1

Taula 3 Percentatge de contaminació per colesterol de diferents albúmines.

4.1.3 Efecte de la de β -ciclodextrina

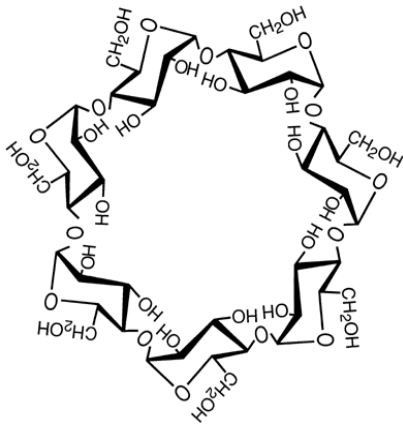
Segons s'ha referit en l'apartat 4.1.2, l'albúmina presentava diversos inconvenients com a acceptor de colesterol: gran variabilitat en els resultats i baixa eficàcia.

Així doncs, necessitàvem acceptors de colesterol alternatius que permetessin obtenir una modificació substancial del contingut de colesterol en les membranes dels espermatozoides i una bona reproductibilitat dels resultats, per tal de poder correlacionar, en el seu cas, la sortida de colesterol amb els nivells de RA assolits.

Els liposomes de diferent composició lipídica (DPPC, EPC, etc) han estat també utilitzats per diversos autors (Ehrenwald i col. 1988a) com a acceptors de colesterol. Tanmateix, en un treball del nostre grup (Morros i col. 1995) s'havia detectat la contaminació de les membranes dels espermatozoides amb fosfolípids (DPPC) constituents dels liposomes, probablement per fusió liposomes-membranes. Per aquest motiu vàrem descartar aquest tipus d'acceptor de colesterol.

Irie i col·laboradors van estudiar la inclusió de diversos lípids en diferents ciclodextrines (l'alfa, la beta i la gamma) (Irie i col. 1992). Aquests autors varen trobar que l'alfa-ciclodextrina tenia més especificitat per fosfolípids, la beta-ciclodextrina pel colesterol i la gamma-ciclodextrina no tenia especificitat ni pels fosfolípids ni pel colesterol. Donat que la beta-ciclodextrina era més específica pel colesterol, Kilsdonk i col. van utilitzar diferents tipus de β -ciclodextrines per estimular la sortida de colesterol d'hepatòcits i de fibroblats (Kilsdonk i col. 1995). Les β -ciclodextrines (Figura 25), oligosacàrids cíclics consistents en unitats de 7 glucopiranoses, són molècules solubles en aigua amb una cavitat hidròfoba que les fa capaces d'interaccionar amb substàncies hidròfobes, fent augmentar llur solubilitat en solució aquosa (Pitha i col. 1988). Les β -ciclodextrines s'han utilitzat com a transportadors de fàrmacs (Amato i col. 1992) i se n'han

buscat derivats per tal de millorar la seva capacitat de dissoldre components hidròfobs i de reduir la seva toxicitat (Frijlink i col. 1991).



Donat que la β CD té una alta especificitat pel colesterol s'ha suggerit que aquest component podria ser efectiu per modificar la composició de colesterol *in vivo*.

Figura 25 Estructura de la β -ciclodextrina.

4.1.3.1 Contingut de colesterol i percentatge de reacció acrosòmica en espermatozoides tractats amb diferents concentracions de β CD

En primer lloc es va estudiar l'efecte de la concentració de β CD afegida al medi, sobre la sortida de colesterol de les membranes dels espermatozoides, durant un temps d'incubació de 150 min. El mètode d'incubació amb β CD s'ha descrit a l'apartat 3.2.3. El mètode de determinació dels nivells de colesterol s'ha descrit a l'apartat 3.2.6. Els resultats es mostren a la Figura 26.

En incrementar la concentració de β -ciclodextrina entre 2 i 16 mM, s'observa una progressiva sortida de colesterol de les membranes de l'espermatozoide, segons una corba de saturació aparentment hiperbòlica. A baixes concentracions de β CD (2 mM) la sortida de colesterol ja ha assolit, aproximadament la meitat de la sortida total. La corba arriba pràcticament

Resultats

a la saturació entre 8 i 16 mM amb un valor del 65% de sortida de colesterol.

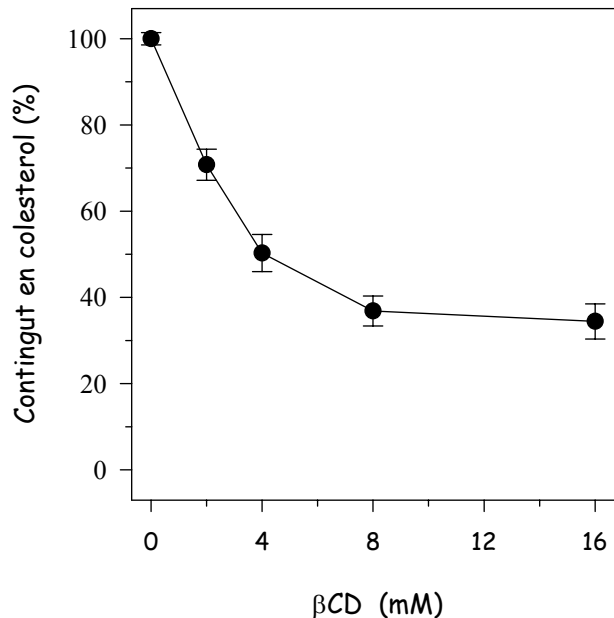


Figura 26 Percentatge de colesterol no esterificat contingut en espermatozoides tractats amb diferents concentracions de β CD durant 150 minuts. Els valors expressats són mitjanes \pm SEM ($n = 4$).

Per altra part, es va estudiar la reacció acrosòmica (RA) induïda pel mateix rang de concentracions de β CD durant el mateix temps d'incubació. El percentatge de RA es va determinar al laboratori del grup d'Immunologia de la Reproducció (IBB, UAB), segons el mètode descrit a l'apartat 3.2.4. La determinació de la RA ens serveix també com a referència de la capacitació: tots els espermatozoides "reaccionats" hauran d'haver capacitat abans. Això no vol dir que tots els espermatozoides capacitats "reaccionin". En contrast amb la corba de saturació hiperbòlica de la sortida de colesterol, el

Resultats

percentatge de RA en funció de la concentració de β CD (vegeu Figura 27) sembla seguir una corba sigmoïdal. A concentracions per sota de 2mM, el percentatge de RA és extremadament baix, mentre que entre 2 i 4 mM experimenta un augment considerable, que es fa més moderat per concentracions superiors.

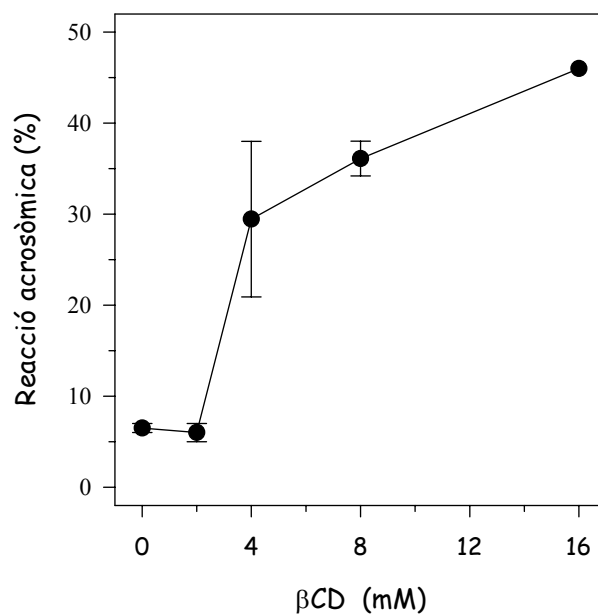


Figura 27 Percentatge de reacció acrosòmica fisiològica d'espermatozoides tractats amb diferents concentracions de β CD durant 150 minuts. Els valors expressats són mitjanes \pm SEM ($n = 2$).

El conjunt de resultats anteriors indica que en 150 min d'incubació en β CD 2 mM, un 30% del colesterol surt de les membranes dels espermatozoides, però aquesta concentració no indueix RA. Només quan surt més colesterol de les membranes, sembla que aquestes siguin més

susceptibles per sofrir els canvis que donen lloc a la RA. Quan la sortida de colesterol arriba fins a un 50%, a 4 mM de β CD, s'observa més de la meitat de la RA màxima obtinguda. Una sortida de colesterol d'entre 50% i 65% és capaç d'induir la RA. Però concentracions de β CD més grans de 8 mM no donen ja una sortida de colesterol significativament major ni un augment significatiu de la RA; aquests resultats suggereixen que l'augment de la RA és un efecte directe de la sortida de colesterol sense que la β CD s'uneixi a les membranes. De fet, alguns autors han demostrat que durant la sortida de colesterol de les membranes dels eritròcits induïda per β CD, la unió d'aquesta substància a les membranes és negligible (Ohtani i col. 1989).

4.1.3.2 Contingut de colesterol en el medi de capacitació d'espermatozoides tractats amb β -ciclodextrina

Com a control complementari de la sortida de colesterol de les membranes dels espermatozoides es va determinar el contingut de colesterol en el medi d'incubació on s'havia de trobar solubilitzat per la β CD. Prèviament s'havia comprovat que la presència de β CD en el medi no interferia en el mètode de quantificació del colesterol (vegeu 3.2.6). Es varen incubar els espermatozoides en presència de 8 mM de β CD durant 30 minuts i es va trobar una sortida de colesterol de $4.93 \mu\text{g} \pm 0.53 \mu\text{g}$ (mitjana \pm Sem, $n = 3$). Al mateix temps es va analitzar el sobrenedant i es va trobar $5.18 \mu\text{g} \pm 2.37 \mu\text{g}$ de colesterol (mitjana \pm Sem, $n = 3$). L'increment del colesterol solubilitzat es correlaciona perfectament amb el colesterol eliminat de les membranes dels espermatozoides, fet que prova que el colesterol és eliminat per la β -ciclodextrina.

4.1.3.3 Vitalitat dels espermatozoides tractats amb diferents concentracions de β -ciclodextrina

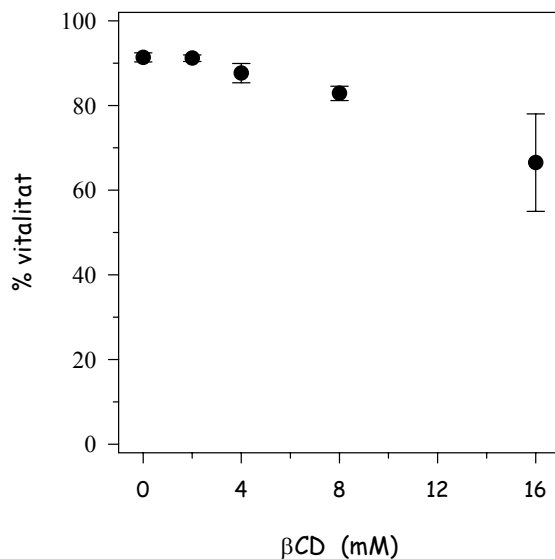


Figura 28 Vitalitat dels espermatozoides tractats amb diferents concentracions de β CD durant 150 minuts. Els valors expressats són mitjanes \pm SEM (n = 5).

Per tal d'assajar la possible toxicitat de la β -ciclodextrina en els espermatozoides, es va determinar el percentatge de la vitalitat per tinció amb *Trypan blue* (3.2.4). Els resultats es mostren en la Figura 28. En totes les concentracions de β CD entre 2 mM i 8 mM es va obtenir un alt percentatge de vitalitat comprès entre el 80% i el 95% sense diferències significatives ($p > 0.05$) respecte al control, mentre que a 16 mM la vitalitat només va ésser d'un 68%, amb diferència significativa ($p < 0.05$) respecte del control.

És per això que es va escollir la concentració de 8 mM com a concentració òptima per als posteriors estudis cinètics de la sortida de colesterol i de reacció acrosòmica i per als estudis de fluïdesa de membrana.

4.1.3.4 Efecte del temps d'incubació en β -ciclodextrina sobre el contingut en colesterol i sobre el percentatge de reacció acrosòmica

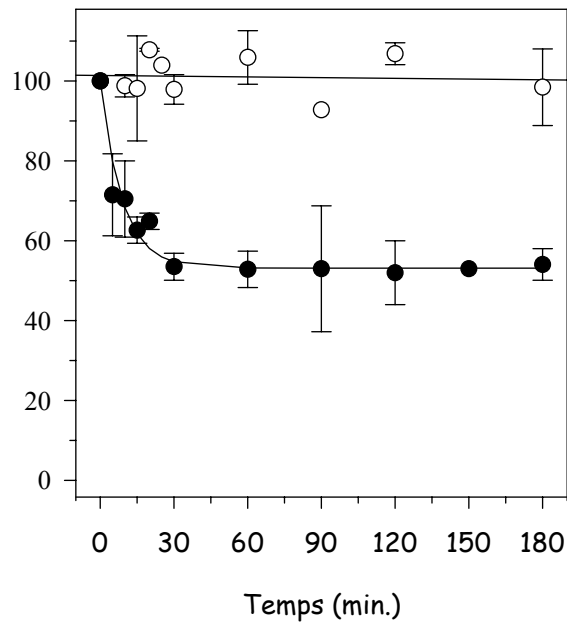


Figura 29 Cinètica de la sortida de colesterol no esterificat de les membranes dels espermatozoides per β CD 8 mM (rodones negres) en comparació amb la dels controls (rodones blanques). Els valors expressats són mitjanes \pm SEM (n = 4).

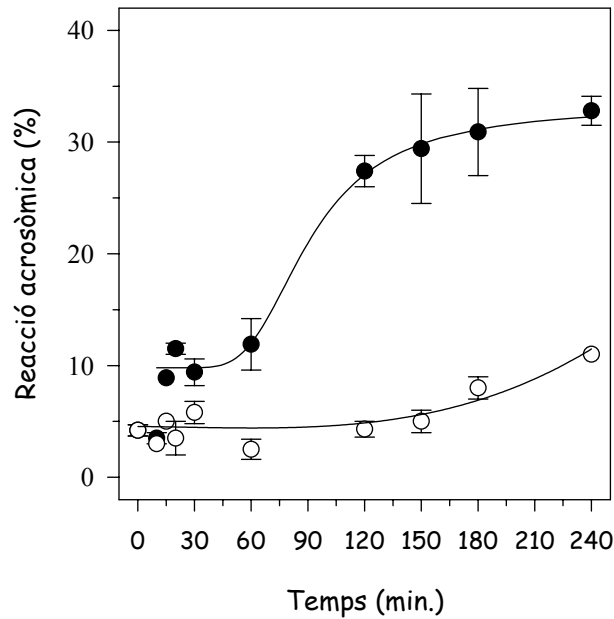


Figura 30 Cinètica de la RA obtinguda en espermatozoides tractats amb β CD 8 mM (rodones negres) en comparació amb la dels control (rodones blanques). Els valors expressats són mitjanes \pm SEM (n = 3).

A la Figura 29 es presenta el percentatge de colesterol romanent en els espermatozoides després de diferents temps d'incubació amb β -ciclodextrina (β CD) 8 mM tal i com s'ha descrit en l'apartat 3.2.3. Els nivells de colesterol a diferents temps s'expressen com a % respecte del nivell de colesterol en espermatozoides control a temps zero. S'observa una ràpida sortida de colesterol, que segueix una exponencial negativa (vegeu Figura 29), en la qual la meitat de colesterol surt durant els 10 primers minuts. Després de 30 minuts d'incubació, la corba s'aproxima al nivell asimptòtic essent el 47% del colesterol eliminat.

Resultats

Quan es va analitzar el percentatge de reacció acrosòmica dels espermatozoides tractats a diferents temps amb β CD 8 mM (vegeu Figura 30), es va obtenir una corba que sembla seguir una sigmoide. Durant els primers 60 min no es va observar cap canvi significatiu, mentre que entre els 60 min i els 120 min hi va haver un augment brusc de la reacció acrosòmica que va tendir a la saturació per temps més llargs. Cal remarcar doncs, que, mentre que la major part de la sortida de colesterol es donava durant els primers minuts, l'augment de la reacció acrosòmica no s'inicia fins a partir de 60 min.

4.1.3.5 Contingut de fosfolípid en espermatozoides tractats amb β -ciclodextrina

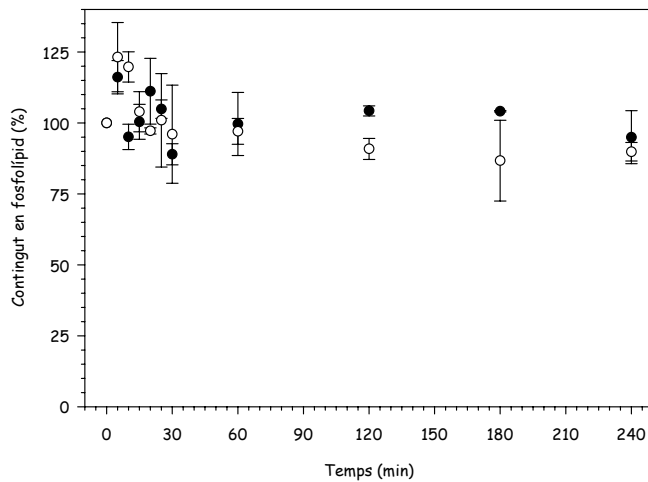


Figura 31 Contingut de fosfolípid en espermatozoides control (rodones negres) i en espermatozoides tractats amb β CD 8 mM (rodones blanques) a diferents temps. Valors expressats com a mitjanes \pm SEM (n = 3).

Encara que és conegut que la β CD té preferència per la solubilització del colesterol i no dels fosfolípids (vegeu 4.1.3) es va fer un estudi del contingut de fosfolípid en espermatozoides tractats amb β CD 8 mM (rodones blanques) a diferents temps d'incubació (vegeu Figura 31). Mentre

que en presència de β CD 8 mM s'obté una pèrdua important de colesterol, els nivells de fosfolípids totals de les membranes dels espermatozoides romanen inalterats, és a dir, el contingut de fosfolípids en els espermatozoides després dels diferents temps d'incubació amb β CD no varia significativament ($p > 0.05$) respecte del control (rodones negres).

4.1.4 Efecte de l'heparina

Per tal de comprendre el mecanisme pel qual la β CD promou tant una sortida ràpida de colesterol com un increment del percentatge de la reacció acrosòmica es va voler investigar l'efecte de la presència d'heparina en el medi d'incubació. Per molts autors l'heparina és considerada com un inductor de la RA, la qual eliminaria les *coating proteins* de la superfície de la membrana de l'espermatozoide (vegeu l'apartat de la introducció 1.4) (Parrish i col. 1988; Sanz i col. 1993).

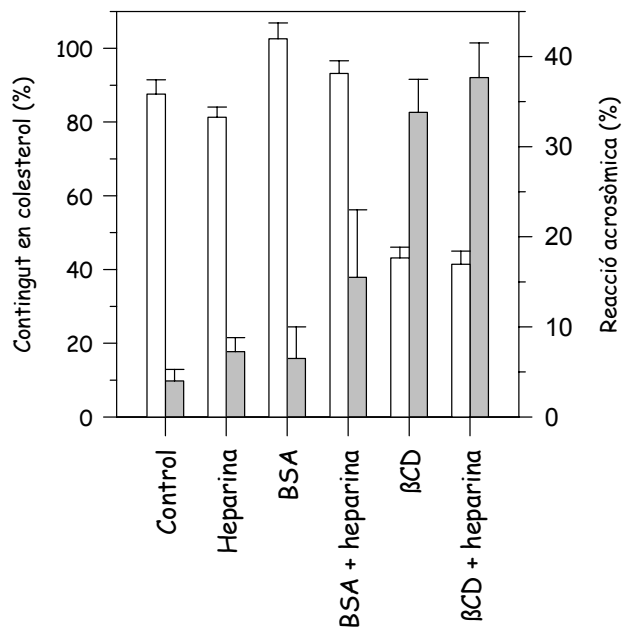
4.1.4.1 *Contingut de colesterol i percentatge de reacció acrosòmica en espermatozoides tractats amb heparina*

En els nostres experiments la incubació dels espermatozoides de boc en presència de 20 μ g/ml d'heparina durant dues hores i mitja no va ser capaç d'induir ni la sortida de colesterol ni la RA (vegeu Figura 32). La presència de 10 mg/ml d'albumina tampoc va induir sortida de colesterol ni RA. Tanmateix, la incubació en presència de 10 mg/ml d'albumina i de 20 μ g/ml d'heparina alhora va mostrar un efecte sinèrgic, encara que moderat, sobre la RA, tot i que la concentració de colesterol no va canviar. Tant la RA com la sortida de colesterol es van veure notablement incrementades amb la

Resultats

sola presència de β CD 8 mM. No obstant, la incubació dels espermatozoides amb 8 mM de β CD i 20 mg/ml d'heparina alhora no va modificar significativament l'efecte de la β CD sola. Per tant, es pot concloure que la β CD és capaç, tant d'eliminar el colesterol de les membranes dels espermatozoides com de promoure la RA sense la cooperació de l'heparina.

Figura 32 Efecte de la presència d'heparina en el contingut de colesterol (barres blanques) i en la RA (barres grises) d'espermatozoides de boc incubats amb diferents medis durant 150 min.



4.1.5 Efecte de la progesterona

Amb el present experiment es pretenia obtenir informació sobre el significat biològic dels nostres estudis *in vitro*. La progesterona és reconeguda per diversos autors com un bon disparador fisiològic de la RA (Parinaud i col. 1992; Rathi i col. 2003).

4.1.5.1 Percentatge de RA en espermatozoides tractats amb progesterona

Per a dur a terme l'eliminació del colesterol, es va utilitzar el mètode descrit a 3.2.3, però modificat tal com es descriu a continuació. Els espermatozoides es van incubar en presència de 8 mM de β CD, en aquest cas durant només 5 minuts. A continuació les cèl·lules es van rentar per tal d'eliminar l'excés de ciclodextrina (vegeu 3.2.3), realitzant-se les centrifugacions a 300xg, i es van incubar durant 2 hores en presència (o absència en el cas dels controls) d'1 μ g/ml de progesterona. Tot seguit es van tornar a rentar les cèl·lules (vegeu 3.2.3.1) per tal d'eliminar la progesterona del medi. La determinació de la RA i de la vitalitat dels espermatozoides es va dur a terme segons 3.2.4.

Tal i com es mostra a la Figura 33 la progesterona per si sola no és un inductor de RA. D'altra banda, la incubació en presència de β CD 8 mM, encara que només durant 5 min, ja és suficient per induir la RA per si sola, però en presència de progesterona el percentatge de cèl·lules "reaccionades" augmenta significativament. Així es pot establir una relació entre la sortida de colesterol, com a component de la capacitació, i la inducció de la RA fisiològica.

Resultats

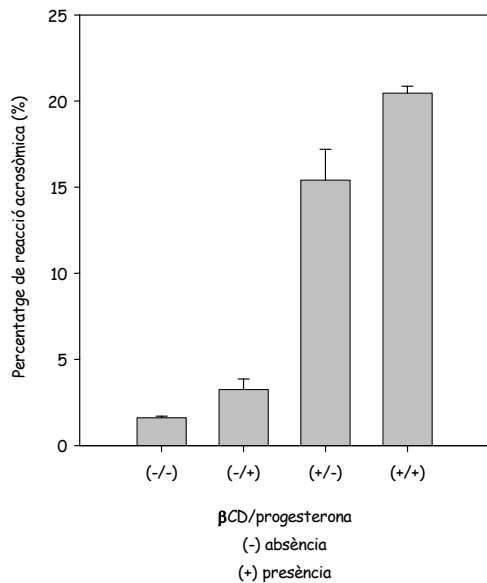
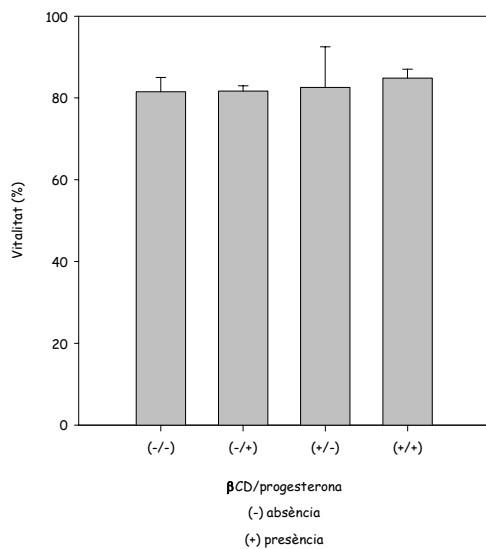


Figura 33 Increment de la reacció acrosòmica (RA) en espermatozoides de boc incubats durant 2h en presència de progesterona, i prèviament tractats amb β CD 8 mM durant 5 min.

4.1.5.2 Vitalitat dels espermatozoides tractats amb progesterona



Tal i com es mostra a la Figura 34 la vitalitat dels espermatozoides tractats amb β CD i progesterona es va mantenir, en tot moment, superior al 80%, sense diferències significatives amb els espermatozoides control.

Figura 34 Vitalitat dels espermatozoides tractats amb β CD i progesterona.

4.2 Estudis biofísics de les membranes d'espermatozoides mitjançant anisotropia de fluorescència

Un dels objectius (vegeu apartat 2) del present treball era l'estudi, per mètodes biofísics, de l'organització estructural dels lípids de les membranes ("fluidesa de membrana") dels espermatozoides, i dels seus possibles canvis induïts per la sortida de colesterol. Es pretenia obtenir informació, a nivell molecular, sobre els mecanismes pels quals la sortida de colesterol podia induir la capacitació i la RA.

4.2.1 Optimització de la tècnica d'anisotropia de fluorescència

Els fonaments teòrics de l'anisotropia de fluorescència i la metodologia experimental, tal com s'ha dut a terme, s'han descrit a l'apartat 3.3.1.

Tanmateix, part de l'esmentat objectiu era metodològic: modificar l'equipament espectrofluorimètric del nostre laboratori per tal de poder treballar d'una manera automatitzada i, a la vegada, adaptar l'estratègia experimental a aquest nou funcionament. El fet de treballar de forma automatitzada permetia, no solament estalviar la presència de l'experimentador/a durant el temps, força llarg, d'adquisició de dades, sinó també eliminar els probables efectes que podrien tenir sobre els resultats les variacions en la cinètica, inevitables quan es treballa de forma no automatitzada. Els resultats dels treballs d'optimització es presenten tot seguit.

4.2.1.1 *Espectres d'excitació i d'emissió del DPH*

En els estudis d'anisotropia de fluorescència es va utilitzar com a sonda fluorescent el 1,6-difenil-1,3,5-hexatriè (DPH) (vegeu l'apartat 3.3.1.2). Per tal de determinar els màxims d'excitació i d'emissió de l'esmentat fluoròfor quan es troba incorporat a la bicapa lipídica es van adquirir els espectres d'excitació i d'emissió (vegeu els apartats 3.3.1.6.a i 3.3.1.6.b respectivament) d'una mostra de liposomes de DPPC, d'una altra mostra de liposomes provinents d'extractes lipídics d'espermatozoides control i finalment a partir d'una mostra d'espermatozoides vius, en les membranes dels quals s'havia incorporat el DPH (vegeu l'apartat 3.3.1.5). Les concentracions utilitzades van ser de 0.3 mg de DPPC per ml de tampó TBS, de 600×10^6 espermatozoides/1.7 ml de tampó TBS quan es tractava d'extractes lipídics i de 50×10^6 espermatozoides vius/ml de medi M-199 sense vermell de fenol.

Els espectres es van adquirir de dues maneres. En primer lloc s'adquirien els espectres utilitzant els dos monocromadors, d'excitació i d'emissió (i, per tant, sense filtres) en format L; les esclatxes utilitzades en aquesta disposició varen ser de 2 nm i 4 nm pel canal d'excitació i de 8 nm i 8 nm pel canal d'emissió. Així s'obtenien els espectres característics del DPH (vegeu Figura 35, Figura 36 i Figura 37) Les longituds d'ona dels màxims van resultar ser de 360 nm per l'excitació i 430 per l'emissió. D'altra banda es va voler comprovar quins canvis sofrien els espectres en les nostres condicions de treball (vegeu apartat 3.3.1.6.c), és a dir, quan fèiem estudis d'anisotropia de fluorescència per tal d'obtenir les corbes de transició de fase. En aquest cas les esclatxes varen ser de 2 i 4 nm pel canal

Resultats

d'excitació i 0 i 0 nm pel d'emissió (ja que els filtres suplien els nomocromadors). Els resultats es mostren a la Figura 38, Figura 39, i Figura 40.

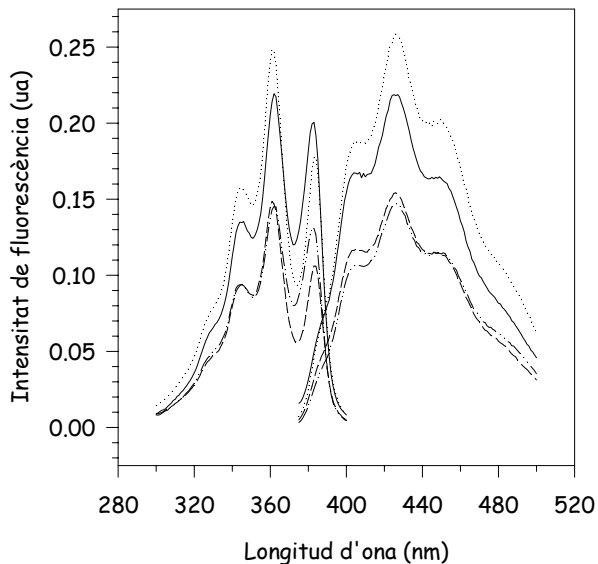


Figura 35 Espectres d'excitació i d'emissió del DPH en una mostra de liposomes de DPPC (0.3 mg/ml) en tampó TBS a 20°C. Cada espectre és adquirit amb una combinació dels polaritzadors d'excitació i d'emissió diferent: — I_w , - - - I_{vH} , - - - I_{hV} , I_{hH} . Sense filtres i amb les esclatxes: 2, 4, 8 i 8.

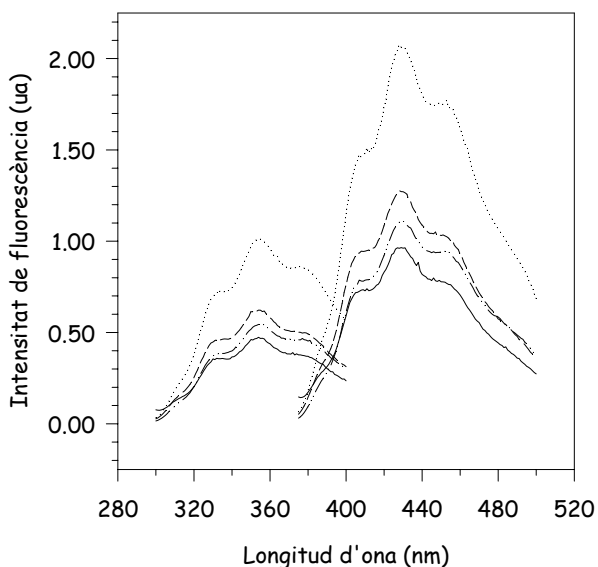


Figura 36 Espectres d'excitació i d'emissió del DPH en una mostra de liposomes provinents d'extractes lipídics d'espermatozoides control (600×10^6 cèl·lules/1.7 ml) en tampó TBS a 37°C. Cada espectre és adquirit amb una combinació dels polaritzadors d'excitació i d'emissió diferent: — I_w , - - - I_{vH} , - - - I_{hV} , I_{hH} . Sense filtres i amb les esclatxes: 2, 4, 8 i 8.

Resultats

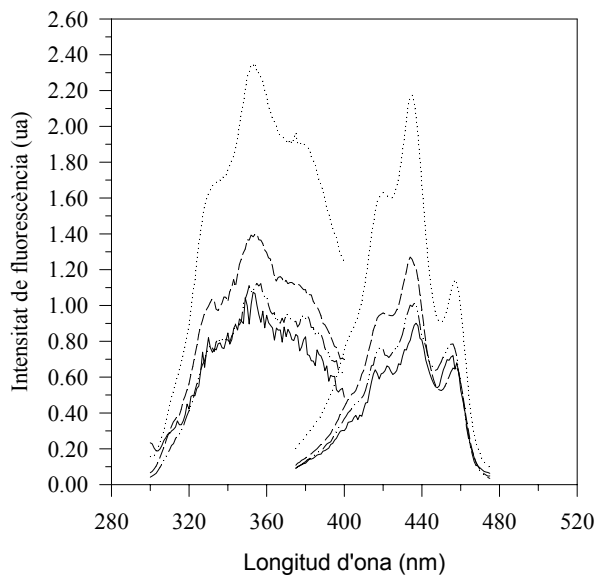


Figura 37 Espectres d'excitació i d'emissió del DPH en una mostra d'espermatozoides control (50×10^6 cèl·lules/1.7 ml) en medi M-199 sense vermell de fenol a 37°C . Cada espectre és adquirit amb una combinació dels polaritzadors d'excitació i d'emissió diferent: — I_w , - - - I_{VH} , - · - I_{HV} , ···· I_{HH} . Sense filtres i amb les esclatxes: 2, 4, 8 i 8.

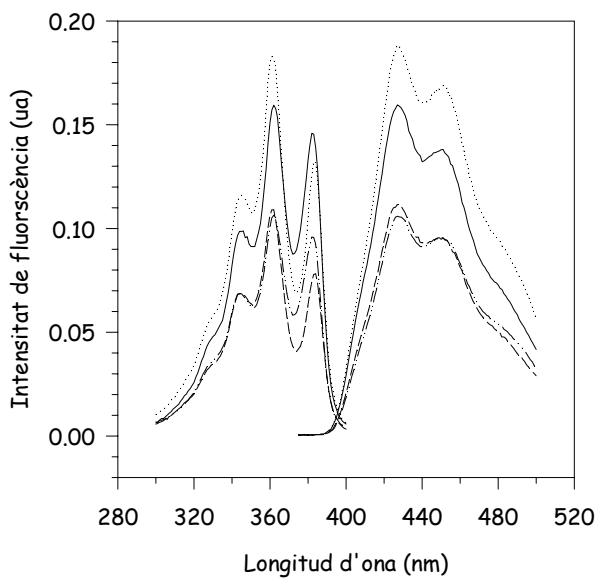


Figura 38 Espectres d'excitació i d'emissió del DPH en una mostra de liposomes de DPPC (0.3 mg/ml) en tampó TBS a 20°C . Cada espectre és adquirit amb una combinació dels polaritzadors d'excitació i d'emissió diferent: — I_w , - - - I_{VH} , - · - I_{HV} , ···· I_{HH} . Amb filtres (2B) i amb les esclatxes: 2, 4, 0 i 0.

Resultats

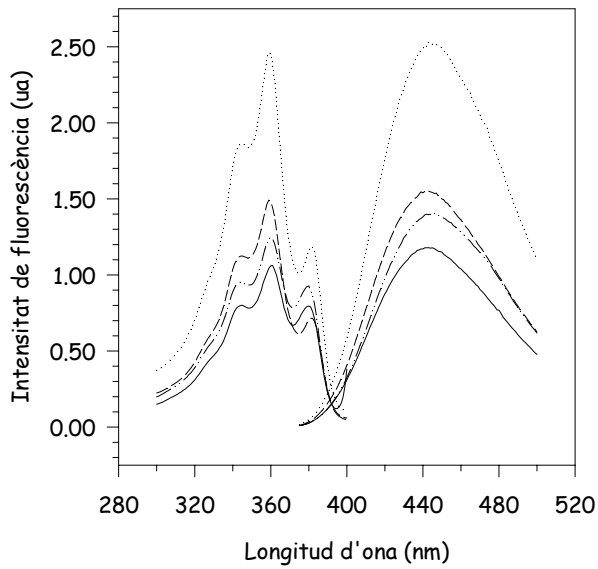


Figura 39 Espectres d'excitació i d'emissió del DPH en una mostra de liposomes provinents d'extractes lipídics d'espermatozoides control (600×10^6 cèl·lules/1.7 ml) en tampó TBS a 37°C . Cada espectre és adquirit amb una combinació dels polaritzadors d'excitació i d'emissió diferent: — I_{VV} , - - - I_{VH} , --- I_{HV} , I_{HH} . Amb filtres (2B) i amb les esclatxes: 2, 4, 0 i 0.

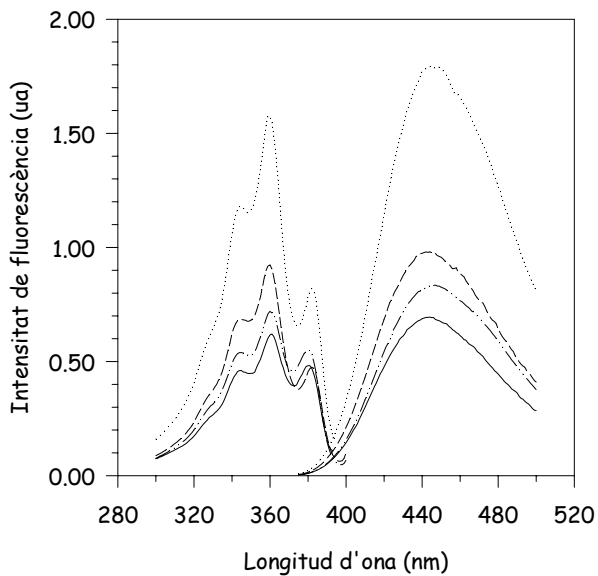


Figura 40 Espectres d'excitació i d'emissió del DPH en una mostra d'espermatozoides control (50×10^6 cèl·lules/1.7 ml) en medi M-199 sense vermell de fenol a 37°C . Cada espectre és adquirit amb una combinació dels polaritzadors d'excitació i d'emissió diferent: — I_{VV} , - - - I_{VH} , --- I_{HV} , I_{HH} . Amb filtres (2B) i amb les esclatxes: 2, 4, 0 i 0.

4.2.1.2 *Espectres d'emissió control*

A l'inici d'aquesta sèrie d'experiments es va controlar, mitjançant adquisició d'espectres d'emissió, la possible contribució a la fluorescència del tampó TBS, del medi M-199 i del medi M-199 sense vermell de fenol i del propi fluoròfor, DPH, a la concentració acostumada (vegeu l'apartat 3.3.1.5), però en absència de lípids i a diferents temperatures, per sota i per sobre de la transició de fase dels fosfolípids, 20°C i 55°C respectivament. En cap cas hi va haver emissió de fluorescència significativa. Cal destacar que aquest darrer control permet descartar la contribució, a l'anisotropia de fluorescència, del fluoròfor que pogués quedar dissolt, sense incorporar-se a les membranes. De totes maneres, pel que fa al DPH, aquest resultat era esperable, donat que el seu coeficient de partició entre els components lipídic i aquós és altament favorable a la membrana, i que, en aigua, el DPH forma micel·les o agregats no fluorescents. Així doncs, a diferència d'altres sondes fluorescents, no és necessari eliminar l'anomenat "excés de reactiu" del medi.

4.2.1.3 *Espectres d'absorció UV control*

També es van adquirir, amb els espectrofotòmetres Perkin Elmer 320 i Cary 3 Bio, els d'espectres d'absorció dels diferents medis i tampons abans citats, per tal d'assegurar l'absència d'absorció UV-Vis en tot l'interval de longituds d'ona utilitzat.

El medi M-199 va presentar un espectre d'absorció amb un màxim al voltant de 430 nm, just on el DPH té el màxim d'emissió (vegeu Figura 35).

Al adquirir un espectre d'excitació del DPH en liposomes de fosfatidilcolina d'ou a 37°C (a aquesta temperatura la fosfatidilcolina està en fase cristall-líquid) en medi M-199 (0.3 mg/ml) es perdia senyal (intensitat de fluorescència) perquè part de la radiació emesa era absorbida pel vermell de fenol del medi, és a dir, hi havia apantallament (*quenching*). Per aquest fet, en tots els estudis fets per anisotropia de fluorescència, espectroscòpia confocal i citometria de flux es va utilitzar el mateix medi, M-199, però sense vermell de fenol per tal que no interferís en les mesures de fluorescència.

4.2.1.4 Optimització dels filtres

El nostre espectrofluorímetre (SLM-Aminco 8100) està equipat amb un monocromador intercalat en el canal esquerre d'emissió (l'utilitzat normalment en la configuració L de l'aparell), però no té monocromador en el canal dret (3.3.1.4); per tant, la radiació emesa que arriba als dos detectors (fotomultiplicadors) és diferent en composició i intensitat. Si volem que les condicions siguin les mateixes en els dos detectors es pot eliminar el monocromador d'emissió, però ara s'haurà d'intercalar filtres que supleixin aquesta funció. Un filtre ideal seria un filtre *sharp-cutting* o *cut off*, que proporcionés un 0 % de transmissió per $\lambda \leq 380$ nm i un 100 % per $\lambda > 380$ nm (vegeu els espectres de fluorescència del DPH a la Figura 35), per tal d'evitar l'arribada als detectors de la radiació d'excitació, centrada a 360 nm, via *scattering* degut a la mostra. Es van provar cinc filtres diferents:

El filtre 44 de gelatina (*Wratten Kodak*) té un 0 % de transmissió a 360 nm i un 3 % a 430 nm. El seu màxim de transmissió és del 57 % a 490 nm. Per altra banda a 570 nm torna a tenir un 0 % de transmissió. Encara que no donava problemes de dispersió de la llum (*scattering*) tenia molt poca transmissió al màxim d'emissió del fluoròfor.

El filtre 47B, també de gelatina (Kodak), té prop d'un 1 % de transmissió a 360 nm, suficient per a deixar entrar radiació de *scattering*, fet que contribuïa a donar un senyal fals. El seu màxim coincideix amb el màxim d'emissió del fluoròfor (Figura 35), és a dir, 430 nm, on té un 50% de transmissió. A 510 nm ja té un 0 % de transmissió.

El filtre 2B, igualment de gelatina (Kodak), absorbeix la radiació ultraviolada. Té un 0 % de transmissió a 360 nm i un 75 % a 430 nm. És un filtre tipus *cut off* que, a partir de 390 nm, deixa passar tota la llum .

El filtre 2B de polièster (Lee), presenta les mateixes característiques que el 2B de Kodak, però va donar problemes perquè al ser de polièster polaritzava la llum i falsejava els resultats.

El filtre 53860 d'Oriel, és un filtre de tipus *band-pass*, que deixa passar només una banda amb una amplada de 9 nm a mitja alçada amb el màxim a 501.5 nm. Al tenir una amplada de banda tan estreta i allunyada del màxim d'emissió del fluoròfor (Figura 35) donava també molt poca senyal i calia treballar amb els fotomultiplicadors al màxim de la seva capacitat

Finalment, el filtre 2B (Kodak) va ser considerat l'òptim: no permetia el pas de radiació d'excitació mitjançant *scattering* i presentava una elevada

transmitància a 430 nm, màxim d'emissió del fluoròfor (Figura 35). Per a tots els estudis d'anisotropia es va utilitzar aquest filtre.

4.2.1.5 Cinètica d'incorporació del DPH

Per tal d'establir el temps d'incubació dels liposomes o bé dels espermatozoides sencers en presència de DPH, es va dur a terme un estudi de la cinètica d'incorporació del DPH. El què es pretenia era saber el temps que calia perquè la sonda s'incorporés totalment en els lípids components de la membrana i així assegurar-nos l'estabilització de la fluorescència emesa abans de començar l'experiment. Com a control preliminar es van dur a terme cinètiques d'incorporació del DPH en liposomes de DPPC i tot seguit, en liposomes provinents de lípids extrets d'espermatozoides i en espermatozoides sencers. Els liposomes o els espermatozoides es van preparar tal i com es descriu a 3.2.8 i 3.2.9 respectivament. Es van adquirir intensitats de fluorescència de manera automatitzada (vegeu 3.3.1.6), però a una temperatura fixa, sempre per sobre de la T_m . (55°C per la DPPC i 37°C pels liposomes provinents de lípids extrets d'espermatozoides i pels espermatozoides sencers). Es va començar l'experiment amb mostres en absència de DPH i, al cap d'uns segons, es va afegir el DPH (5 μ L d'una dissolució 0.733 mM en THF) a la cubeta, mitjançant una xeringa Hamilton a través d'un forat en la tapa el portamostres, i a les fosques, quedant la suspensió de mostra a la mateixa concentració que la utilitzada en tots els altres experiments. La λ d'excitació, l'interval de λ de la fluorescència emesa, i la resta de condicions experimentals es van establir com es descriu a 3.3.1.6.c.

Resultats

Tal com es pot observar a les Figura 41, Figura 42 i Figura 43, amb només els 10-30 min inicials ja hi ha temps suficient perquè el DPH s'incorpori a les membranes. Així, en tots els experiments d'anisotropia de fluorescència es va deixar el DPH durant 30 minuts per tal d'assegurar la seva incorporació a les membranes i l'estabilització de la fluorescència emesa.

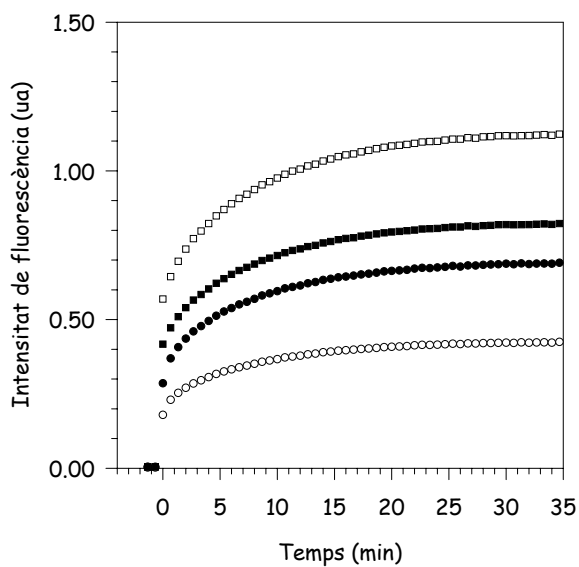


Figura 41 Cinètica d'incorporació del DPH en liposomes de DPPC 0.3 mg/ml en TBS a 55°C. • I_{VV}, ○ I_{VH}, □ I_{HV}, ■ I_{HH}.

Resultats

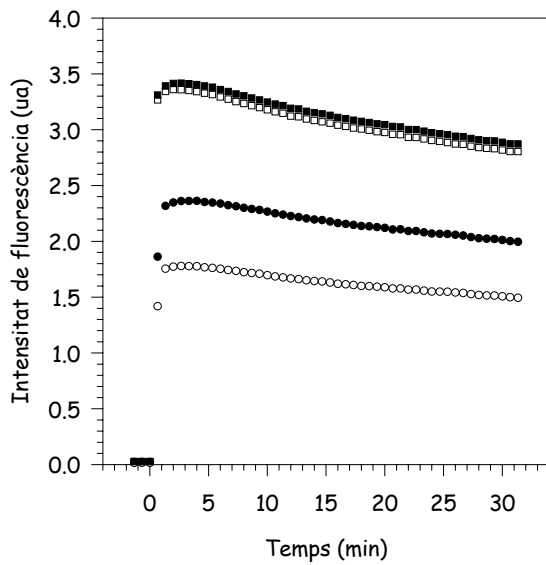


Figura 42 Cinètica d'incorporació del DPH en liposomes de lípids extrets d'espermatozoides a partir de 300×10^6 cèl·lules/ml en TBS a 37°C . • I_{VV}, ○ I_{VH}, □ I_{HV}, ■ I_{HH}.

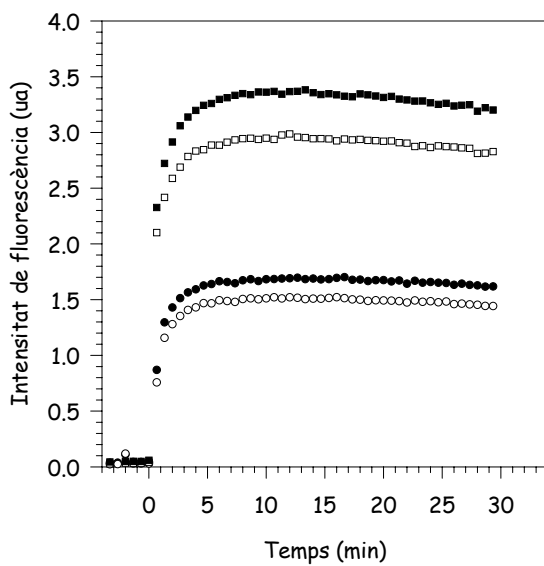


Figura 43 Cinètica d'incorporació del DPH en espermatozoides 50×10^6 cèl·lules/ml en TBS a 37°C . • I_{VV}, ○ I_{VH}, □ I_{HV}, ■ I_{HH}.

4.2.1.6 Vitalitat dels espermatozoides marcats amb DPH

Per tal d'assajar la possible toxicitat del DPH en els espermatozoides es va determinar el percentatge de la vitalitat per tinció

Resultats

amb *Trypan blue* (vegeu l'apartat de Material i Mètodes 3.2.4) Tal i com es pot observar a la Taula 4 la vitalitat dels espermatozoides marcats amb DPH es va mantenir, en tot moment, superior al 85%.

Mostra	N° total sp	Vius		Morts	
		N° sp	%	N° sp	%
Sp CNT	444	377	85	67	15
Sp + DPH	365	332	91	33	9

Taula 4 Vitalitat dels espermatozoides marcats amb DPH.

4.2.2 Comportament termotròpic de les membranes dels espermatozoides, mitjançant anisotropia de fluorescència

La representació gràfica de l'anisotropia de fluorescència (r) (vegeu 3.3.1.6.c) en funció de la temperatura és una manera de construir les corbes de transició de fase (vegeu 3.3.1.7) d'un sistema lipídic de membrana, és a dir, de descriure el seu comportament termotròpic.

Segons els resultats descrits a l'apartat 4.1.3.4 la incubació dels espermatozoides de boc amb 8 mM de β CD indueix la sortida de colesterol amb una cinètica que segueix una exponencial decreixent (vegeu Figura 29), i on, la meitat de colesterol sortia durant aproximadament els 6 primers minuts. Després de 30 minuts d'incubació, la corba assoleix el nivell asimptòtic essent el 47% de colesterol eliminat. Es va demostrar també que aquesta sortida de colesterol era suficient per promoure la RA en un 35% de les cèl·lules, però al cap de 2 hores més d'incubació. No hi havia, però, cap increment significatiu de sortida de colesterol entre 30 i 180 min d'incubació. Donat que un objectiu del present treball era investigar els canvis induïts en el comportament termotròpic de les membranes dels

espermatòzoides vius de boc, just després de la sortida de colesterol i abans de la RA, es va escollir 1 hora com a temps òptim d'incubació amb β CD.

4.2.2.1 Comportament termotròpic d'un lípid conegut, DPPC (controls preliminars)

Per tal de contrastar la fiabilitat de la metodologia desenvolupada per nosaltres per estudiar el comportament termotròpic de les membranes d'espermatòzoides, es van realitzar una sèrie de controls previs en un lípid conegut, com és el cas de la DPPC. L'objectiu d'aquests controls era contrastar les temperatures de transició de fase obtingudes per nosaltres amb les descrites a la bibliografia per de la DPPC. A la Figura 44 es pot observar un exemple de comportament termotròpic de la DPPC; els valors d'anisotropia observats (punts plens) es corresponen amb una corba de transició de fase amb la forma típica de sigmoide. A fi de determinar acuradament el valor de la T_m (vegeu 3.3.1.7), es va utilitzar una corba teòrica $r(T)$, que va ser ajustada a cadascuna de les corbes experimentals obtingudes. L'equació teòrica següent proposada per Heyn i col. (Heyn i col. 1981) per a descriure el comportament termotròpic, va ser modificada pel nostre grup segons:

$$r = r_1 + p_1 T + \frac{r_2 - r_1 + p_2 T - p_1 T}{1 + \exp\left(\frac{\Delta H_{vH}}{R}\right)\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_m}\right)}$$

on T és la temperatura expressada en Kelvin, T_m és la temperatura de transició de fase; ΔH_{vH} és l'entalpia de van't Hoff, la qual reflecteix

l'amplada de la transició; com més ample és la transició, més petita és ΔH_{vH} (Heyn i col. 1981). r_1 i r_2 representen les interseccions de les rectes inicial i final amb l'eix d'ordenades en l'origen de temperatures, i p_1 i p_2 representen els pendents d'aquestes rectes. Tots els ajustos es van fer pel mètode dels mínims quadrats amb el programa SigmaPlot 2001 per Windows. El valor mitjà de la T_m fou de 41.44 ± 1.25 (SEM) ($n=5$). Aquest valor no difereix significativament dels descrits en la bibliografia per a suspensions aquoses multilamel·lars de DPPC utilitzant el mateix mètode de polarització de la fluorescència del DPH (40.6°C (Lentz i col. 1978)) o altres com DSC (41.4 (Mabrey i Sturtevant 1976; Mabrey i Sturtevant 1977), 41.3 (Lentz i col. 1978), 41.75 , 41.2 i 41.4 (Biltonen i Freire 1978), 41.4 (Tilcock i Fisher 1979), 41.1 , 41.5 i 41.4 (Chen i col. 1980)).

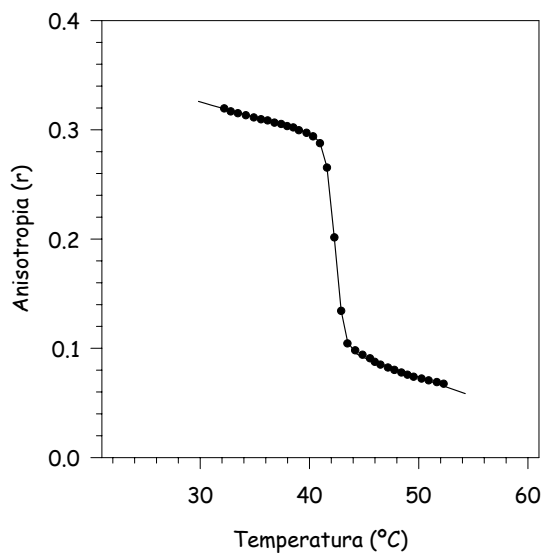


Figura 44 Corba d'anisotropia de fluorescència d'un lípid conegut, la DPPC (punts) amb el corresponent ajust teòric (línia contínua).

4.2.2.2 Comportament termotròpic de liposomes provinents d'extractes lipídics d'espermatozoide

A la Figura 45 es comparen dos exemples de les corbes de transició de fase que es van obtenir experimentalment a partir de liposomes d'extractes lipídics provinents d'espermatozoides control (rodones negres) i d'espermatozoides tractats (rodones blanques). En ambdues mostres s'observa una davallada progressiva dels valors d'anisotropia, que es correspon amb una corba de transició de fase amb la forma típica de sigmoide. Per tal de determinar acuradament els diferents paràmetres característics d'aquest tipus de corbes es va utilitzar la següent corba teòrica (Heyn i col. 1981; Grancelli i col. 2002) que va ser ajustada a cadascuna de les corbes experimentals $r(T)$ obtingudes:

$$r = r_1 + \frac{r_2 - r_1}{1 + \exp\left(\frac{\Delta H_{vH}}{R}\right)\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_m}\right)}$$

on T és la temperatura expressada en Kelvin; T_m és la temperatura de transició de fase; ΔH_{vH} és l'entalpia de van't Hoff, la qual reflecteix l'amplada de la transició; com més ample és la transició, més petita és ΔH_{vH} (Heyn i col. 1981). r_1 i r_2 representen els valors asimptòtics inicial i final, respectivament, de la corba, i, per tant, els valors màxim i mínim, respectivament, de l'anisotropia dins la corba. Tots els ajustos es van fer pel mètode dels mínims quadrats amb el programa SigmaPlot 2001 per Windows.

Resultats

Les línies contínues de la Figura 45 representen els resultats dels ajustos teòrics dels corresponents experiments. Els coeficients de determinació van ser de $R = 0.9999$ i $R = 0.9996$ per aquestes mostres, control i tractada respectivament.

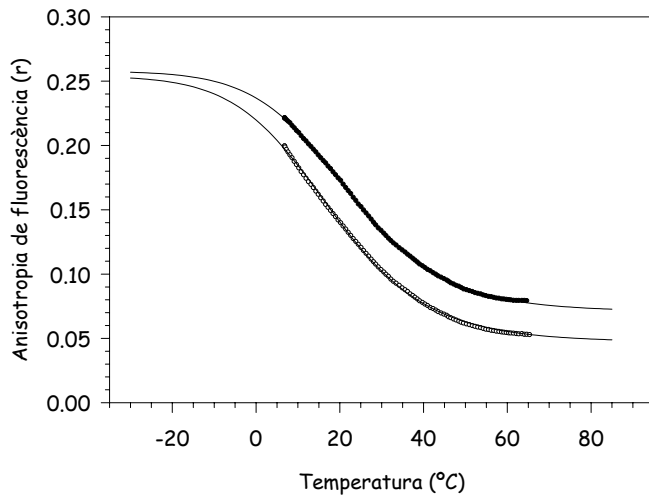


Figura 45 Corbes d'anisotropia de fluorescència enfront de la temperatura, de liposomes provinents d'extractes lipídics d'espermatozoides control (rodones negres) i d'espermatozoides tractats amb β CD 8 mM durant 1 h (rodones blanques) amb els corresponents ajustos teòrics (línies contínues). Per a cada corba es van obtenir 100 punts experimentals.

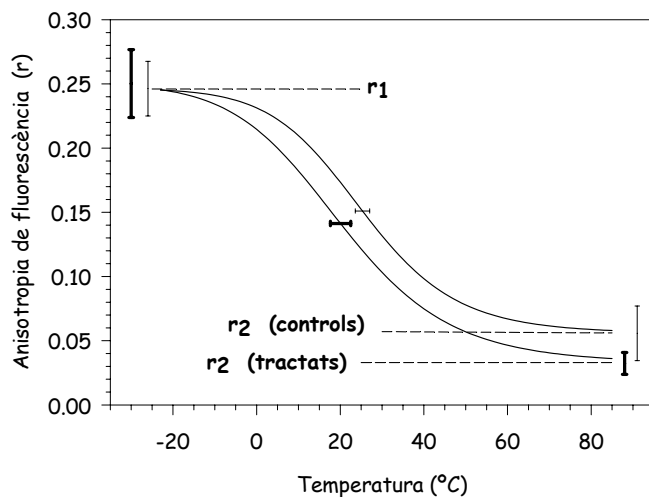


Figura 46 Corbes teòriques obtingudes a partir dels ajustos de diferents mostres control ($n = 7$) (corba superior) i tractades amb β CD ($n = 9$) (corba inferior). Les barres d'error dibuixades representen l'error estàndard de les mitjanes (SEM) dels paràmetres r_1 , r_2 i T_m per a les mostres control i tractades (en negreta).

A la Figura 46 es mostren les corbes teòriques obtingudes a partir de diferents mostres control ($n=7$) o tractades amb β CD ($n=9$). Cada corba

Resultats

ha estat calculada introduint en l'equació anterior la mitjana de cada paràmetre (r_1 , r_2 , T_m i ΔH_{vH}). En tots els casos els coeficients de determinació van ser iguals o superiors a $R \geq 0.9989$. Aquestes dades es resumeixen a la Taula 5.

	Liposomes provinents d'espermatozoides control (n=7)	Liposomes provinents d'espermatozoides tractats amb β CD (n= 9)	<i>t</i> -Student
T_m (°C)	25.3 \pm 1.7	20.1 \pm 0.8	$p < 0.001$
ΔH_{vH} (kJ · mol ⁻¹)	68.1 \pm 7.0	54.2 \pm 1.5	$p > 0.05$
r_1	0.246 \pm 0.008	0.250 \pm 0.009	$p < 0.05$
r_2	0.056 \pm 0.008	0.032 \pm 0.003	$p < 0.01$

Taula 5 Valors dels paràmetres (mitjanes \pm SEM) obtinguts a partir dels ajustos a les dades experimentals.

A temperatures inferiors a la T_m , l'anisotropia de fluorescència (r) assoleix un *plateau* sense diferències significatives entre les mostres control i les tractades amb β CD; es podria dir que els valors de r_1 són independents del contingut de colesterol de la bicapa lipídica (vegeu Figura 46 i Taula 5). No obstant, a temperatures superiors a la T_m el valor de r_2 de les mostres tractades amb β CD és significativament més baix que el de les mostres control, indicant que la sortida de colesterol de les membranes incrementa la fluïdesa de l'extracte lipídic en la fase cristall-líquid. També cal destacar que la T_m és significativament més baixa per les mostres tractades amb β CD ($T_m = 20^\circ\text{C}$) que per les mostres control ($T_m = 25^\circ\text{C}$). L'entalpia de van't Hoff, ΔH_{vH} decreix (vegeu la Taula 5), indicant que la transició és més ample (Heyn i col. 1981).

Resumint, els canvis majoritaris de la sortida de colesterol es produeixen en l'increment d'anisotropia ($\Delta r = r_1 - r_2$) i en el valor de la T_m . No hi ha canvis significatius en l'anisotropia inicial r_1 .

4.2.2.3 Comportament termotròpic d'espermatozoides sencers

Per tal de poder correlacionar els possibles canvis en el comportament termotròpic amb la sortida de colesterol de les membranes, de totes les mostres que s'havien d'estudiar per anisotropia de fluorescència se'n va prendre una alíquota per mesurar-ne la sortida de colesterol. En aquestes mostres, després d'incubar els espermatozoides en presència de β CD 8 mM durant 1 h (vegeu 3.2.3), la sortida de colesterol fou del $41\% \pm 4.2\%$ (mitjana \pm SEM, $n=6$). Aquest resultat no presenta cap diferència significativa amb la sortida de colesterol obtinguda en l'estudi cinètic anterior (vegeu apartat 4.1.3.1) que, per a 1 h d'incubació, fou aproximadament del 47%.

A la Figura 47A, es mostra la corba de transició de fase tal com es va obtenir experimentalment per a una de les mostres d'espermatozoides control (punts plens). Es pot observar que, en el cas d'espermatozoides sencers, la corba experimental segueix un patró més complex que la dels extractes lipídics (Figura 45) amb dues transicions clares: una per sota de 20°C i l'altra entre 20°C i 60°C . Per tal d'obtenir paràmetres acurats que permetessin descriure aquest comportament termotròpic, es va utilitzar la següent corba teòrica, corresponent a una sigmoide bimodal, que va ser ajustada a les corbes experimentals obtingudes:

$$r = r_1 + \frac{r_2 - r_1}{1 + \exp\left(\frac{\Delta H_{vH,1}}{R}\right)\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{Tm_1}\right)} + \frac{r_3 - r_2}{1 + \exp\left(\frac{\Delta H_{vH,2}}{R}\right)\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{Tm_2}\right)}$$

on T és la temperatura expressada en Kelvin; Tm_1 i Tm_2 són les temperatures de transició de fase; $\Delta H_{vH,1}$ i $\Delta H_{vH,2}$ són les entalpies de van't Hoff, les quals reflecteixen l'amplada de cada transició; com més ample és la transició, més petita és ΔH_{vH} (Heyn i col. 1981). r_1 i r_2 representen els valors asimptòtics inicial i final, respectivament, de la primera transició i r_2 i r_3 representen els valors asimptòtics inicial i final, respectivament, de la segona transició; per tant, aquests valors representen els valors màxims i mínims de l'anisotropia dins de cada transició.

La línia contínua de la Figura 47 A és el resultat d'ajustar aquesta equació a les dades experimentals. El coeficient de determinació de l'ajust va ser de $R=0.9980$.

A la Figura 47 B es mostra el comportament termotròpic d'espermatozoides sencers tractats amb 8 mM de β CD durant 1 hora. En aquest cas la corba de transició de fase també segueix un patró complex amb dues transicions. Cal destacar, però, que l'extensió relativa de les transicions canvia significativament en les cèl·lules tractades respecte de les cèl·lules control: la primera transició és ara per sota de 30°C , mentre que la segona s'extén des de 30°C fins a 65°C . La línia contínua és l'ajust teòric per a les dades experimentals amb un coeficient de determinació de $R=0.9985$.

Resultats

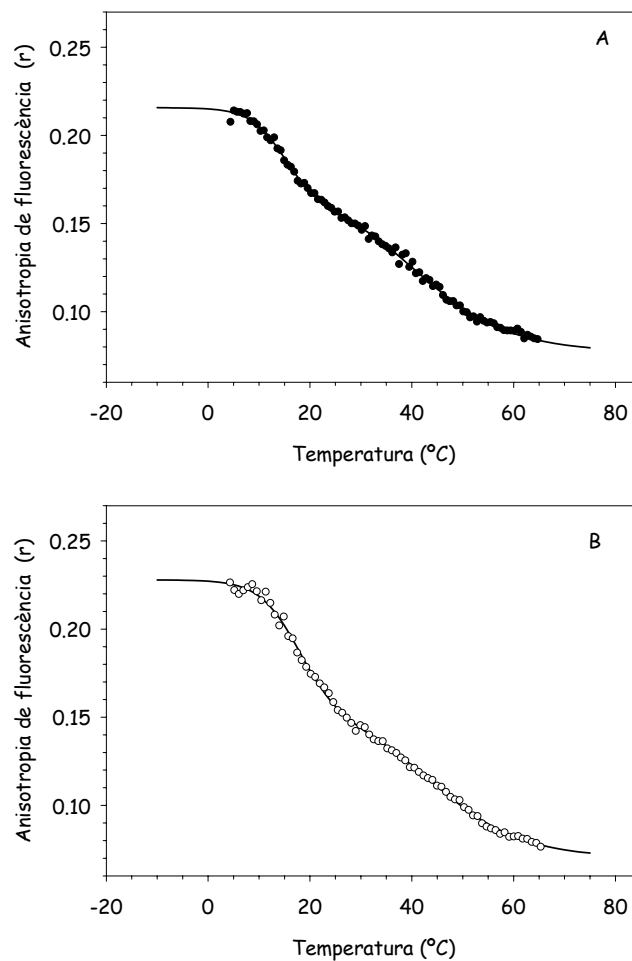


Figura 47 Corbes d'anisotropia de fluorescència (punts) d'espermatozoides control (A) i d'espermatozoides tractats amb β CD 8 mM durant 1 h (B) amb el corresponent ajust teòric (línies contínues). Per a cada corba es van obtenir 100 punts experimentals.

La Figura 48 A i B mostra les corbes teòriques obtingudes després d'ajustar les diferents mostres control (n=6) o tractades amb β CD (n=6), respectivament. Cadascuna d'aquestes corbes teòriques s'ha calculat introduint a l'equació anterior la mitjana de cada paràmetre, tal i com es resumeix a la Taula 6. Els coeficients de determinació per a aquests ajustos sempre varen ser iguals o superiors a $R \geq 0.9930$. També es va intentar

Resultats

d'ajustar aquestes mateixes dades experimentals a una sigmoide unimodal, però, o bé no es podien ajustar o bé el coeficient de determinació era molt més baix.

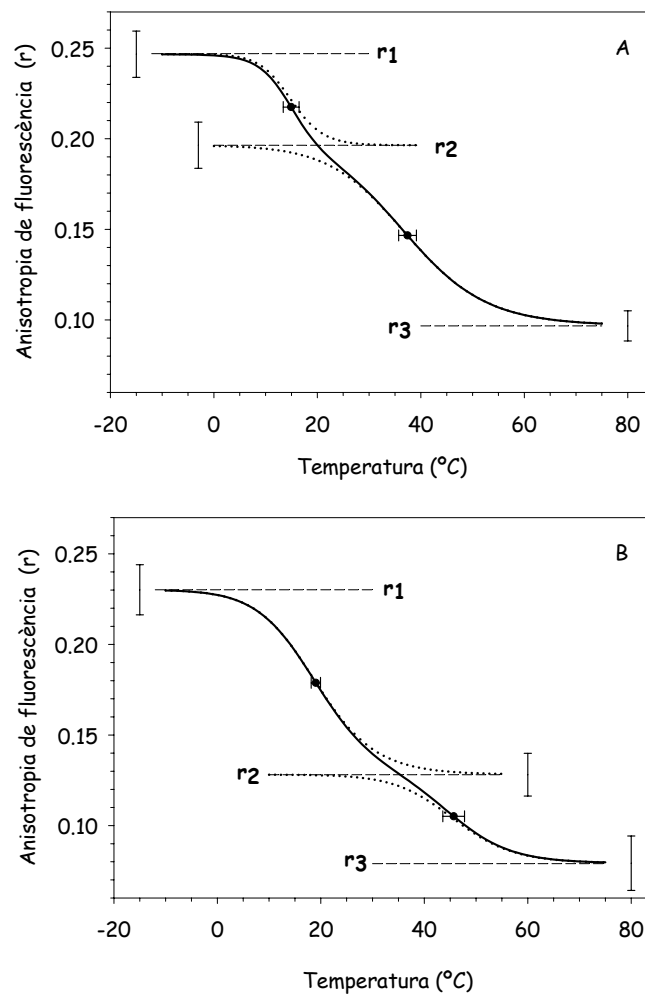


Figura 48 Corbes teòriques obtingudes a partir dels ajustos de diferents mostres control ($n = 6$) (A) i tractades ($n = 6$) (B). Les barres d'error dibuixades representen l'error estàndar de les mitjanes (SEM) dels paràmetres r_1 , r_2 , r_3 , T_{m1} i T_{m2} .

Resultats

	Espermatozoides control (n=6)	Espermatozoides tractats amb β CD (n=6)	<i>t-Student</i>
T_{m1} ($^{\circ}$ C)	14.9 \pm 1.5	19.0 \pm 0.9	$p < 0.05$
T_{m2} ($^{\circ}$ C)	37.4 \pm 1.7	45.7 \pm 2.1	$p < 0.05$
ΔH_{vH1} (kJ \cdot mol $^{-1}$)	224.9 \pm 47.7	123.2 \pm 15.8	$p < 0.05$
ΔH_{vH2} (kJ \cdot mol $^{-1}$)	104.7 \pm 11.5	146.9 \pm 10.5	$p < 0.05$
r_1	0.247 \pm 0.013	0.230 \pm 0.014	$p > 0.05$
r_2	0.196 \pm 0.013	0.128 \pm 0.012	$p < 0.01$
r_3	0.101 \pm 0.009	0.067 \pm 0.011	$p < 0.05$

Taula 6 Valors dels paràmetres (mitjanes \pm SEM) obtinguts a partir dels ajustos a les dades experimentals.

Tal i com es pot veure a la Taula 6 i a la Figura 48 la sortida de colesterol de les membranes de l'espermatozoide, induïda per β CD, incrementa significativament les temperatures de transició, tant la T_{m1} com la T_{m2} . A temperatures clarament per sota de la primera transició, les cèl·lules tractades i les cèl·lules control mostren valors d'anisotropia (r_1) similars entre sí, entre 0.23-0.25 i similars també als mostrats pels extractes lipídics (vegeu Figura 46). No obstant, a temperatures clarament per sobre de la segona transició el valor de l'anisotropia (r_3) de les mostres tractades amb β CD és significativament més baix que el de les mostres control. Per tant, el canvi total d'anisotropia ($r_1 - r_3$) és més gran després de la sortida de colesterol, fet que també s'ha trobat en els liposomes d'extractes lipídics (vegeu Figura 46). A més a més, el rang d'anisotropia comprès entre $r_1 - r_2$ s'incrementa fortament passant de 0.051 a 0.102 a expenses de $r_2 - r_3$ el qual disminueix marcadament, de 0.095 a 0.061.

L'entalpia de van't Hoff $\Delta H_{1,vH}$ decreix després de la sortida de colesterol (vegeu la Taula 6), tal i com s'espera d'una transició més ample (Heyn i col. 1981). Al mateix temps $\Delta H_{2,vH}$ incrementa significativament, tal i com s'espera per a una transició més estreta.

Resumint, els canvis majoritaris induïts per la sortida de colesterol es produeixen en l'increment de l'anisotropia total ($\Delta r = r_1 - r_3$) i en la grandària de les dues transicions ($r_1 - r_2$) i ($r_2 - r_3$), però també hi ha canvis significatius en els valors de les Tm_1 i Tm_2 . No hi ha canvis significatius en l'anisotropia inicial r_1 .

4.3 Detecció de dominis lipídics per microscòpia confocal

Els anteriors estudis han demostrat que la sortida de colesterol de les membranes dels espermatozoides indueix en aquestes membranes canvis dràstics i complexos en el seu comportament termotròpic. Per tal d'establir quins dels macrodominis lipídics d'aquestes membranes estan implicats en els esmentats canvis, es va utilitzar la microscòpia confocal. Aquesta tècnica permet visualitzar canvis en la fluorescència de sondes que presenten diferents afinitats per les diverses regions de la membrana.

El marcatge amb les sondes fluorescents merocianina 540 (MC 540) (marcador de fluïdesa de membrana) i Yo-Pro-1 (marcador de vitalitat cel·lular) d'espermatozoides control i d'espermatozoides tractats amb β CD, es va dur a terme segons s'ha descrit a l'apartat 3.4.1.1.

L'observació directa de les suspensions d'espermatozoides marcats amb MC 540 era força difícil degut a la ràpida fotodegradació de la sonda

(Harrison i col. 1996). No obstant, es van poder identificar diferents patrons a l'adquirir les imatges digitalment (vegeu l'apartat 3.4.1.1.c) (vegeu-ne un exemple a la Figura 49).

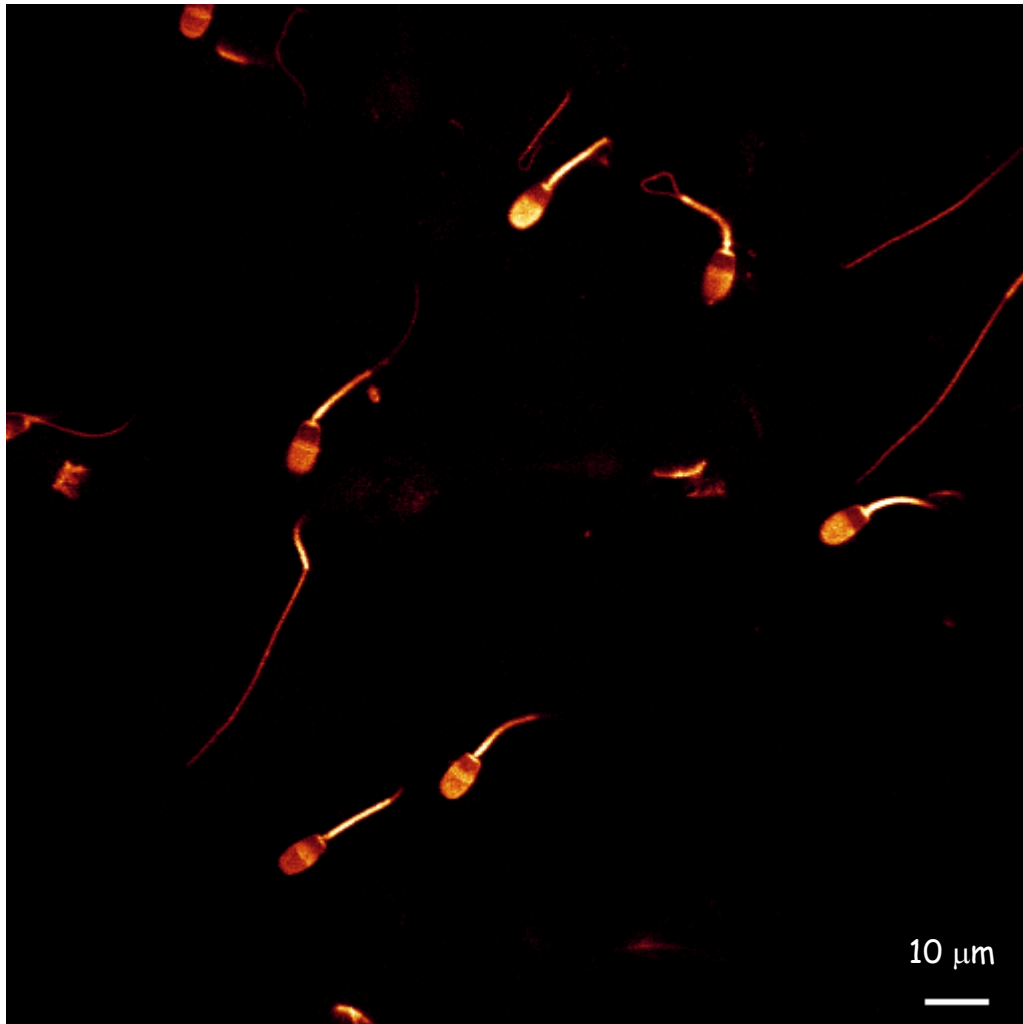


Figura 49 Exemple d'imatge obtinguda per microscòpia confocal.

Utilitzant la metodologia descrita a 3.4.1.1.b i 3.4.1.1.c es van analitzar un total de 368 espermatozoides, dels quals 157 eren control i 211 tractats amb β CD 8 mM durant 1 hora. Cada espermatozoide va ser analitzat individualment segons 3.4.1.1.d per tal d'obtenir la intensitat

Resultats

mitjana de cada zona, que es representava en histogrames (vegeu-ne un exemple clarificador a la Figura 50).

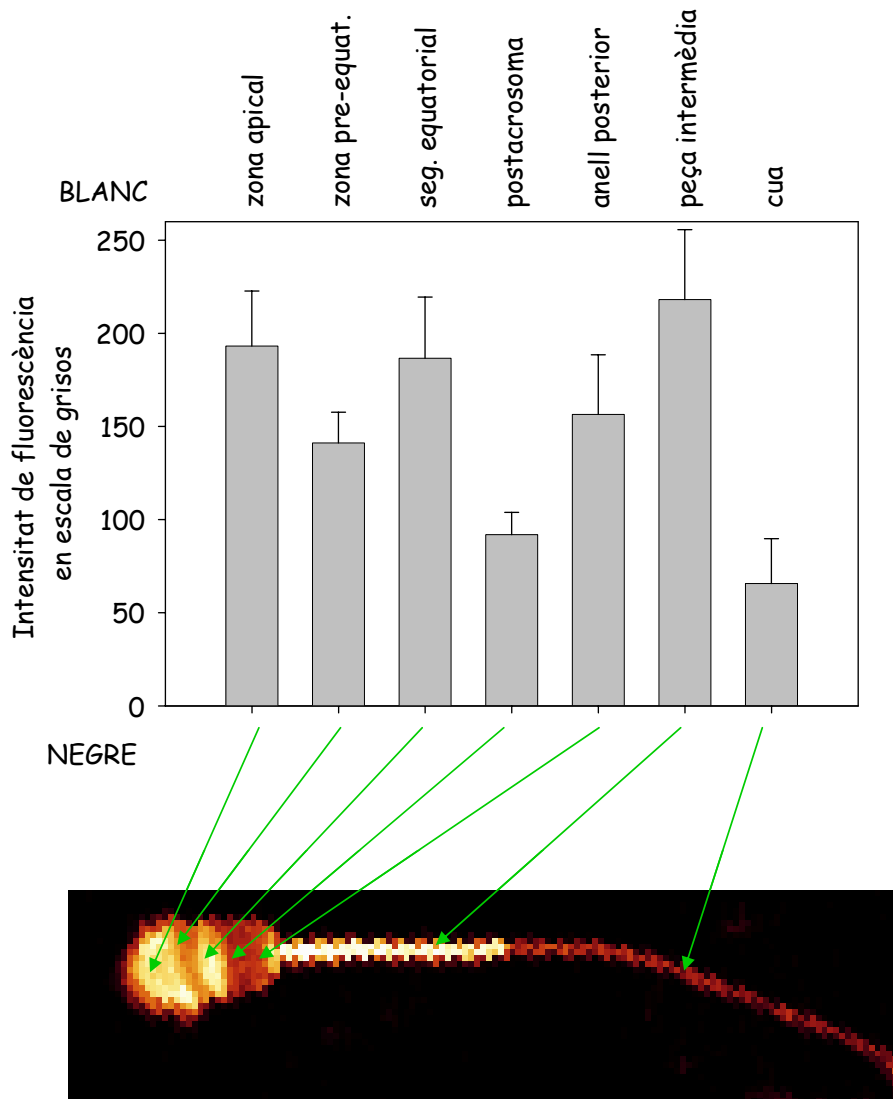


Figura 50 Exemple clarificador de com s'obtenien les intensitats mitjanes de fluorescència de la MC 40 de cada zona de l'espermatozoide.

La distribució de la MC 540 en el conjunt de la membrana plasmàtica dels espermatozoides va "dibuixar" unes regions caracteritzades, ja sigui per un elevat marcatge (indicatiu de fluïdesa), ja sigui per un marcatge reduït (indicatiu de rigidesa). Aquestes regions van resultar coincidir clarament amb les zones morfològiques, amb significat fisiològic,

reconegudes en l'espermatozoide (vegeu 1.7.2). És precisament aquesta diversitat en la distribució de l'afinitat pel fluoròfor MC 540, la que ens ha permès definir patrons de marcatge en la població estudiada. L'avaluació de la distribució d'intensitats relatives, fonamentalment entre les regions 1, 2, i 3, corresponents a l'acrosoma i a la zona equatorial, ens ha permès establir l'existència de quatre patrons de marcatge (vegeu les imatges a la Figura 51 i els histogrames a la Figura 52). Recordem que el postcrosoma ha estat utilitzat com a regió de referència per a normalitzar el conjunt d'intensitats; de manera que sempre li correspon intensitat 1 (vegeu 3.4.1.1.d). Pel que fa a les regions 5, 6 i 7 no han presentat diferències rellevants entre els diferents patrons. Així, es poden observar quatre patrons majoritaris diferents, tot i tenir un tret comú entre ells: un marcatge molt intens de la peça intermèdia i de l'anell nuclear o posterior. Aquests patrons es van definir com: patró A , espermatozoides que presenten tot l'acrosoma marcat; patró B , marcatge limitat al segment equatorial; patró C, marcatge limitat al segment equatorial i a la zona apical de l'acrosoma i patró D on el marcatge es limitat a la zona post-acrosomal. A la Figura 54 es presenten els histogrames que descriuen el repartiment de les intensitats de fluorescència en les diverses regions per a cada un dels quatre patrons (barres negres).

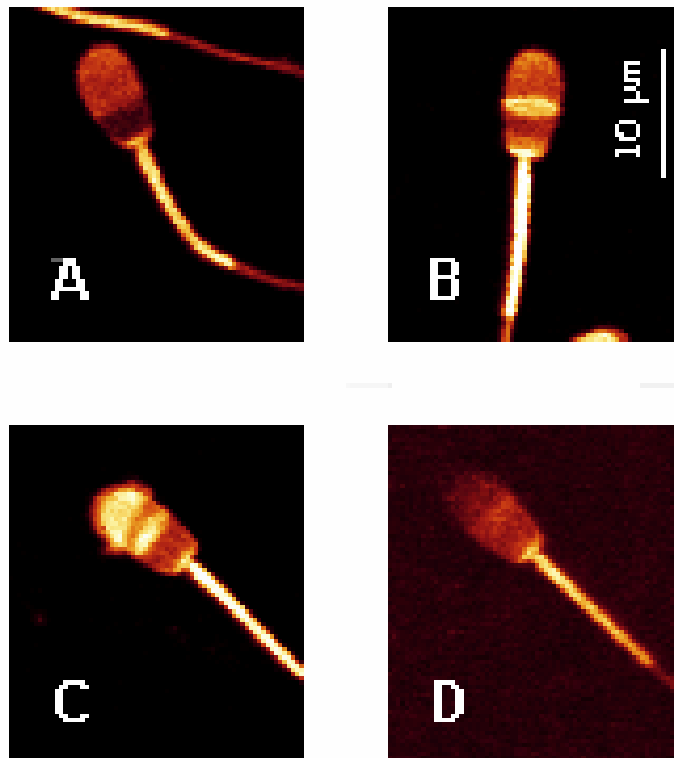


Figura 51 Patrons de marcatge d'espermatozoides de boc amb MC 540.

Tot seguit es va determinar la freqüència de cadascun dels quatre patrons establerts en la població d'espermatozoides. Com es pot veure a la Figura 53, els patrons A, B i C presenten unes freqüències molt altes, 27% per A i B i 32% pel patró C, mentre que el patró D només representa el 12%. El 2% restant correspon a espermatozoides que presentaven patrons diferents dels descrits anteriorment.

A continuació es va dur a terme el mateix tipus d'estudi en espermatozoides tractats amb β CD 8 mM durant 1 hora. Pel que fa als patrons de marcatge es va observar també la presència dels ja esmentats patrons A, B, C i D (vegeu Figura 51), sense que aparegués cap altre nou

Resultats

patró. No obstant, els percentatges per a cada patró van ser significativament diferents respecte als controls: mentre que les freqüències dels patrons A i D van disminuir (17% i 6% respectivament), les freqüències dels patrons B i C varen augmentar (34% i 42% respectivament) (vegeu Figura 53).

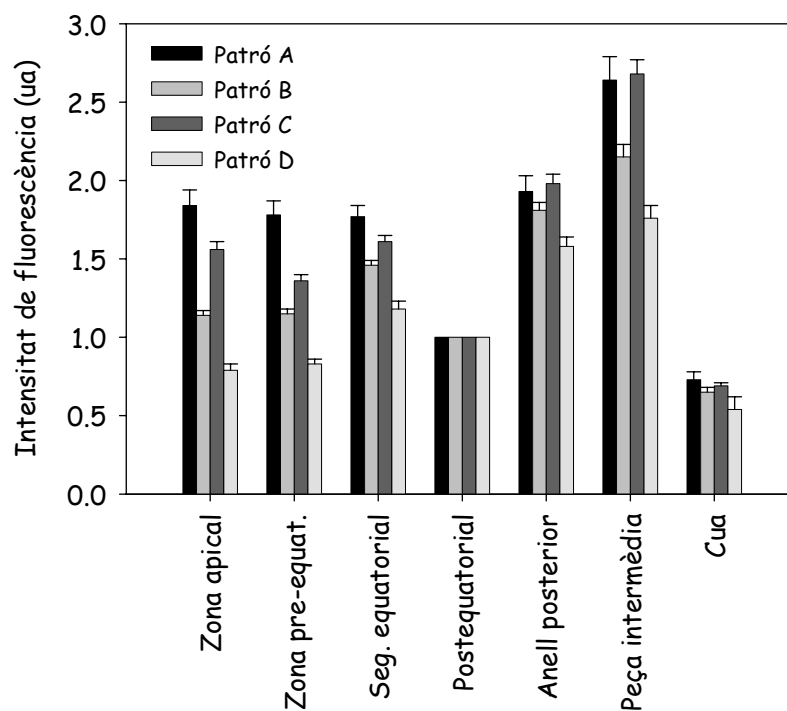


Figura 52 Intensitat mitjana de fluorescència de cada zona dels espermatozoides per a cada patró. Cadascun dels patrons presenta diferències significatives ($p < 0.05$) amb els altres patrons, almenys en alguna de les seves zones.

Resultats

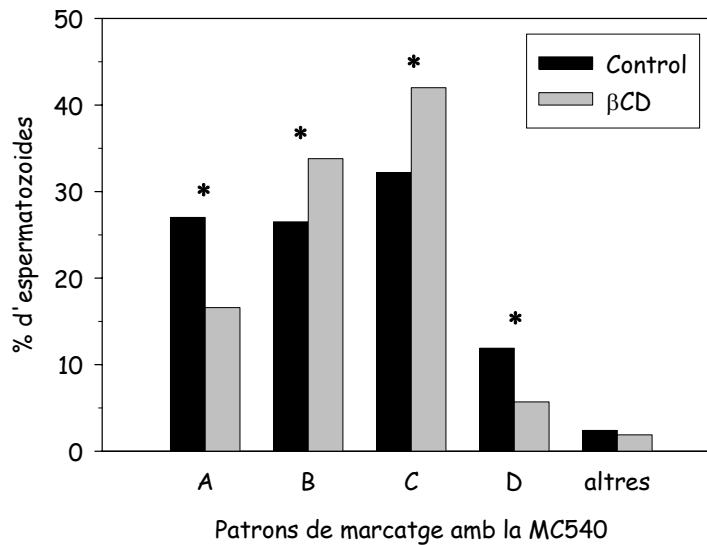


Figura 53 Freqüències per a cada patró de marcatge amb MC 540 (* $p < 0.05$).

Per tal d'avaluar detalladament els possibles efectes del tractament amb β CD, es va analitzar també si aquest tractament induïa canvis significatius en la intensitat del marcatge amb MC 540 de cada zona, sense produir un canvi de patró. Així es van comparar, per a cada patró, les intensitats de fluorescència relativa de cada zona entre la població control i la població tractada (vegeu Figura 54). Només es van trobar diferències significatives en el patró A, on es va observar un augment de la intensitat relativa de fluorescència a tot l'acrosoma (zones 1 i 2), a la zona equatorial, a l'anell posterior i a la peça intermèdia, i en el patró C, únicament a la peça intermèdia.

Resultats

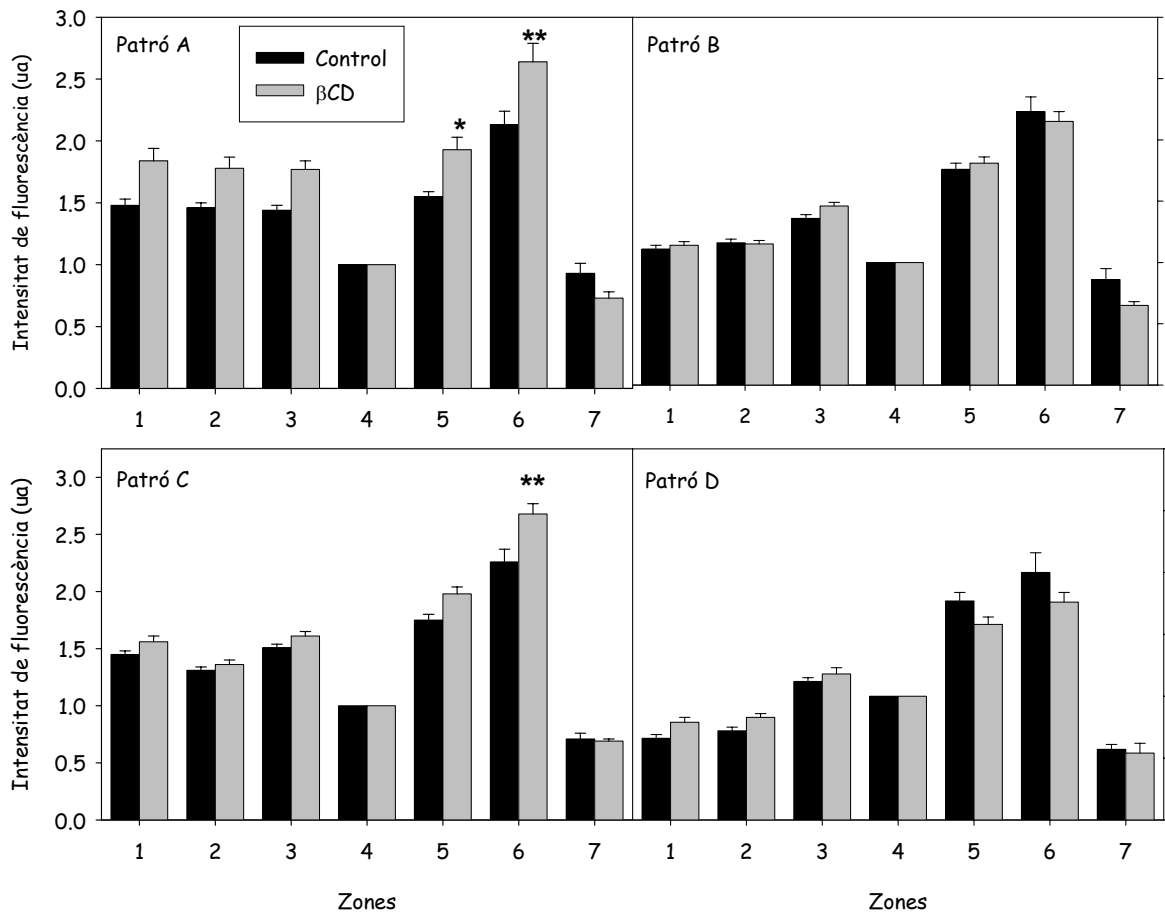


Figura 54 Intensitats relatives de fluorescència de cada regió de l'espermatozoide per a cada patró (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$).

Per tal de saber si algun dels patrons podia ser característic d'espermatozoides morts es va fer un recompte de la vitalitat per a cada patró: el marcatge positiu per Yo-Pro-1 és indicatiu de mort cel·lular. Tal i com es pot veure a la Taula 7, no es pot atribuir un patró d'espermatozoides morts a cap patró de marcatge per MC 540, és a dir, en tots els patrons hi ha un percentatge, d'entre l'11% i el 34%, d'espermatozoides morts.

	<i>Patró A</i>	<i>Patró B</i>	<i>Patró C</i>	<i>Patró D</i>
<i>Vius</i>	81.8	77.8	68.0	75.2
<i>Morts</i>	18.2	22.2	32.0	24.8

Taula 7 Vitalitat dels espermatozoides marcats amb MC 540.

4.4 Distribució poblacional de la fluïdesa de membrana: estudis per citometria de flux

Per tal de poder quantificar, a nivell poblacional, aquests canvis de fluïdesa de membrana dels espermatozoides durant la capacitació, es va utilitzar la citometria de flux.

Com a exemple de la informació que es pot obtenir mitjançant aquesta tècnica s'ha inclòs la Figura 55 on es presenten diferents gràfics de rugositat enfront de grandària per a diferents tipus cel·lulars. El gràfic a) correspon a una mostra cel·lular de sang, havent-ne eliminat abans els hematies (gràfic cedit per Manuela Costa); es poden observar fàcilment tres poblacions ben diferenciades: les cèl·lules grans i més rugoses correspondrien a polimorfonuclears i les més petites i menys rugoses a limfòcits. Per sobre de la població de polimorfonuclears es pot observar una altra població, menys evident perquè és molt més dispersa, i que correspondria a eosinòfils i granulòcits. En el gràfic b) es presenta un línia cel·lular epitelial d'endometri (gràfic cedit per Antoni Iborra) i el gràfic c) correspon a espermatozoides humans (gràfic cedit per Antoni Iborra).

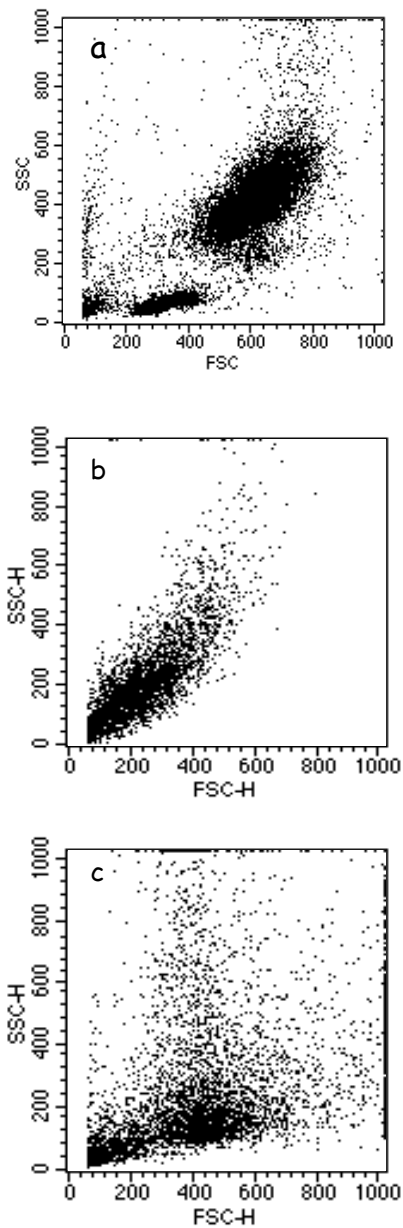


Figura 55 Representacions gràfiques de la grandària enfront de la rugositat, per a diferents tipus cel·lulars (a: mostra de sang, b: línia cel·lular epitelial d'endometri i c: espermatozoides humans) obtingudes per citometria de flux.

Com es pot observar a la Figura 55 cada tipus cel·lular es situa de manera diferent dins dels eixos de coordenades del gràfic, depenent de les seves característiques morfològiques i de la seva grandària. La dispersió depèn de la forma de les cèl·lules, però també de la heterogeneïtat de la mostra (Figura 55a). Una mostra homogènia de cèl·lules molt simètriques, rodones i amb poca rugositat (Figura 56a), donarà poblacions molt poc disperses. Una mostra heterogènia, com la de la Figura 55a, donarà poblacions disperses. Una mostra homogènia de cèl·lules amb poca simetria, o amb molta rugositat (Figura 56b) donarà poblacions més disperses. En el cas dels espermatozoides, encara que la mostra sigui homogènia, el fet de tenir només un eix de simetria (Figura 56c) fa que la població surti molt més dispersa.

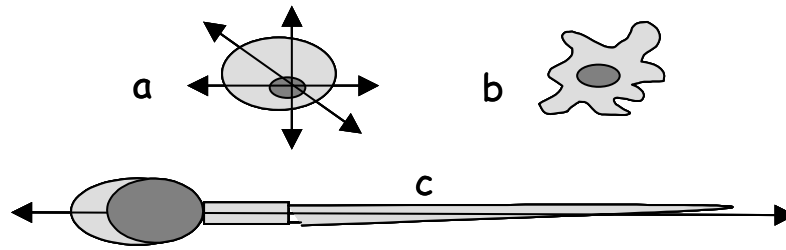


Figura 56 Comparació de la simetria en diferents formes de cèl·lules.

Quan es vol representar poblacions, cal escollir l'escala utilitzada per a la grandària de les cèl·lules (FSC) (vegeu 3.5.1.1). Hi ha cinc escales possibles: E00, E01, E02 i E03 que multipliquen el voltatge, i per tant el senyal per 1, 10, 100 i 1000 respectivament i E-1 que el divideix per 10. Per tant, quan es vulgui comparar gràfics típics de grandària per citometria s'ha de tenir en compte l'escala utilitzada. Així, a la Figura 55, els voltatges per a FSC són E00 pels gràfics a i b i E01 pel c.

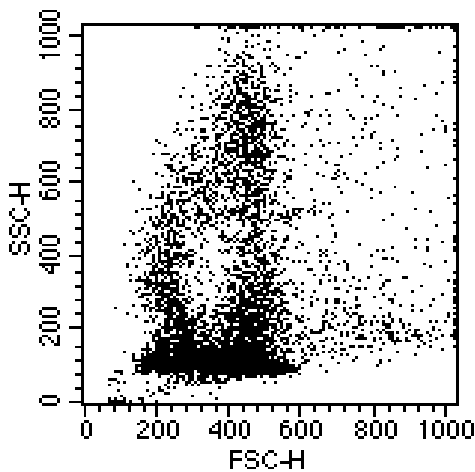


Figura 57 Representació gràfica de la rugositat (SSC) *versus* la grandària de les cèl·lules (FSC) d'espermatozoides de boc.

A la Figura 57 es presenta el gràfic de rugositat (SSC) *versus* grandària (FSC) d'una mostra d'espermatozoides de boc, obtingut segons la metodologia descrita a 3.5.1.1.

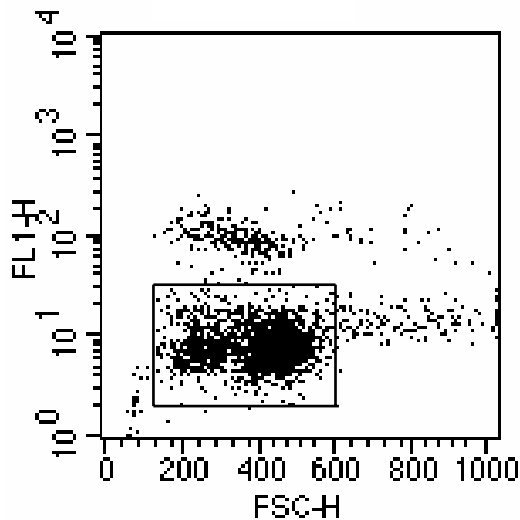


Figura 58 Representació gràfica de la fluorescència del Yo-Pro-1 (FL1) *versus* la grandària (FSC) dels espermatozoides de boc.

A la Figura 58 es representa gràficament la fluorescència del Yo Pro-I (FL1) *versus* la grandària de les cèl·lules (FSC). Es pot observar tres poblacions: la de major grandària, escassa, correspondria a agregats d'espermatozoide (cel·lulars); la població situada a la part posterior correspon a cèl·lules marcades per Yo-Pro-1 i, per tant, mortes. I per últim, la població seleccionada per la finestra correspon a cèl·lules vives; així s'excloïa les cèl·lules mortes i els agregats cel·lulars per a les posteriors anàlisis (vegeu 3.5.1.1). A partir d'aquest moment, i per tal que tots els resultats fossin comparables, es va programar el citòmetre per enregistrar, per a cada mostra, 20.000 esdeveniments, corresponents sempre a cèl·lules vives i no agregades, és a dir, contingudes dins de l'esmentada finestra.

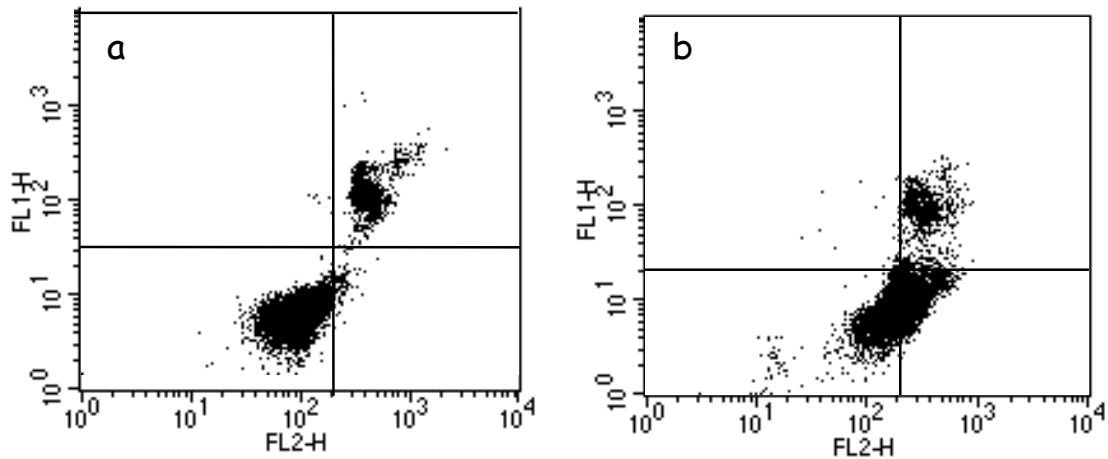


Figura 59 Representació gràfica de la fluorescència del Yo-Pro-1 (FL1) *versus* la fluorescència de la MC 540 (FL2) per a espermatozoides control (a) i tractats amb β CD 8 mM durant 1h (b).

A la Figura 59 es representa la fluorescència del Yo-Pro-1 (FL1) *versus* la fluorescència de la MC 540 (FL2) per a espermatozoides control (a) i tractats amb β CD 8 mM durant 1h (b). Es pot observar que hi ha dues poblacions, la majoritària, en el quadrant inferior, correspon a cèl·lules vives, mentre que la minoritària, en el quadrant superior, correspon a cèl·lules mortes. Com es pot veure, el tractament amb β CD comporta un desplaçament de la població cap a valors de fluorescència de la MC 540 més elevats. Curiosament, pel que fa a les cèl·lules mortes, en la mostra control presenten més marcatge que les vives, mentre que el tractament amb β CD no modifica la seva fluorescència. A partir dels anteriors resultats es van obtenir les corbes de distribució de la fluorescència de la MC 540 (FL2) en la població d'espermatozoides (*counts*) control (línia vermella) i tractats

amb β CD 8 mM durant 1h (línia verda) (Figura 60). Les cèl·lules representades en l'àrea sota la corba són les 20.000 enregistrades d'entre la població de vives i no agregades. Aquest gràfic permet observar més clarament el desplaçament de la població cap a valors de fluorescència més alts, degut al tractament amb β CD. Per tal de tractar estadísticament les diferències entre les dues poblacions (control i tractats amb β CD 8 mM durant 1h) de tots els experiments realitzats ($n = 14$), es van mesurar els valors de les intensitats mitjanes de cada corba i es van obtenir els seus quocients β CD/control. S'observen diferències significatives ($p < 0.05$) entre 1h ($n = 14$) i el temps 0, que per definició sempre serà 1.

Arribat a aquest punt, i gairebé fora dels objectius d'aquesta tesi, es va voler fer un sondeig del què podria passar en temps d'incubació de β CD més llargs. Recordem que entre 2h i 3h d'incubació amb β CD 8 mM es produeix massivament la RA (vegeu Figura 30). Portar a terme aquest estudi mitjançant les tècniques de polarització de fluorescència o de microscòpia confocal era una tasca molt laboriosa, mentre que amb la citometria de flux s'obtenien resultats molt més fàcilment. A les 2h s'observa un augment significatiu de la intensitat mitjana de la fluorescència de la MC 540 en la població d'espermatozoides respecte a 1h de tractament.

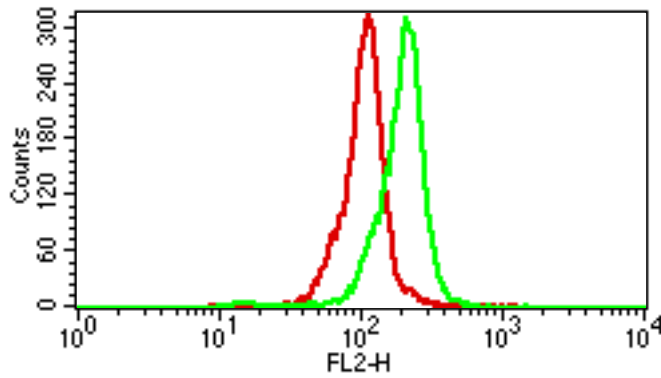


Figura 60 Exemple de corbes de distribució de la fluorescència de la MC 540 (FL2) en la població d'espermatozoides (*counts*) control (línia vermella) i tractats amb β CD 8 mM durant 1h (línia verda).

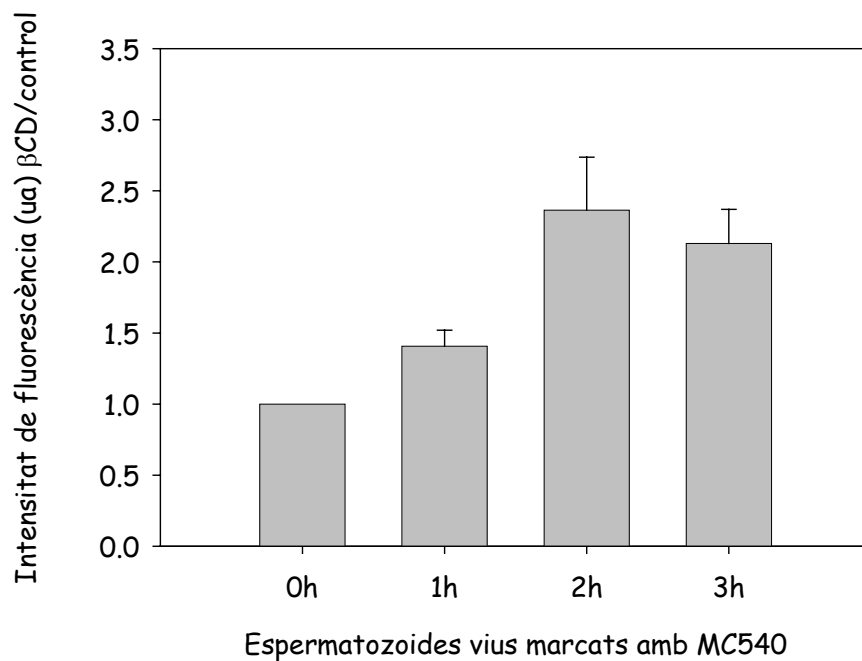


Figura 61 Quocient d'intensitats mitjanes relatives de la fluorescència de la MC 540 en espermatozoides tractats amb β CD 8 mM, a diferents temps d'incubació, respecte d'espermatozoides control. Existeixen diferències significatives ($p < 0.05$) entre 1h (n = 14), 2h (n = 3), 3h (n = 3) i 0h i també entre 1h i 2h.

5 DISCUSSIÓ

5.1 Inducció de reacció acrosòmica per l'eliminació de colesterol de les membranes dels espermatozoides

Hi ha molts fets que recolzen la hipòtesi segons la qual la sortida de colesterol de la membrana plasmàtica dels espermatozoides podria ser un esdeveniment important en la capacitació, però encara no està clar si una sortida massiva de colesterol de la membrana podria induir, per ella mateixa, la reacció acrosòmica (RA). Així, doncs, un dels nostres objectius era trobar un acceptor de colesterol efectiu i determinar si la sortida de colesterol indueix, per ella mateixa, la RA.

Diversos autors han obtingut una sortida significativa de colesterol utilitzant fluids biològics del tracte genital femení com a medi d'incubació (Davis 1982) o bé addicionant components diversos al medi, com l'albumina (Davis i col. 1979; Davis i col. 1980; Go i Wolf 1985) o les lipoproteïnes (Davis 1981; Langlais i col. 1988). Els resultats solen ser controvertits i poc reproduïbles: en cas d'utilitzar fluids biològics, donada la complexitat de la seva composició, és impossible atribuir els canvis produïts a un component determinat. A més a més, la mateixa complexitat dels fluids biològics comporta que la seva composició sigui variable, depenent de factors biològics no sempre controlables. Així, calia trobar un acceptor de colesterol efectiu, que donés resultats reproduïbles.

Altres autors han obtingut un augment de la RA induïda per diferents inductors, com la BSA amb progesterona (Cross 1996a) o la lisofosfatidilcolina, lípid fusogènic (Parrish i col. 1988), però no han demostrat que aquest augment de RA sigui degut a la sortida de colesterol.

5.1.1 Contingut de colesterol i de fosfolípids en espermatozoides intactes

Els estudis de composició lipídica en espermatozoides de boc són ben escassos. Rana i col. obtenen una relació Col/PL de 0.59 (mol/mol) en espermatozoides obtinguts del final de l'epidídim (*cauda*) (Rana i col. 1991). En principi aquesta relació molar hauria de ser comparable amb el nostre resultat en espermatozoides ejaculats (0.32 mol/mol). La clara diferència entre ambdós resultats és atribuïble al fet que la nostra mostra prové d'un extracte lipídic de cèl·lules senceres mentre que la d'aquells autors prové d'un extracte de membrana plasmàtica prèviament aïllada. És conegut que la membrana plasmàtica és rica en colesterol mentre que les membranes dels orgànuls són pobres en aquest lípid.

5.1.2 Efecte de la BSA

La utilització de la BSA com a molècula acceptora de colesterol va presentar un greu problema: la manca de reproductibilitat (vegeu 4.1.2).

Pel que fa als resultats descrits a la bibliografia utilitzant albúmina en el medi de capacitació *in vitro* (Davis i col. 1980; Go i Wolf 1985; Benoff i col. 1993a; Benoff i col. 1993b; Benoff i col. 1993c) s'han obtingut resultats molt contradictoris. Alguns autors obtenen sortida de colesterol (Davis i col. 1979; Go i Wolf 1985; Langlais i col. 1988) i altres no (Davis i col. 1980; Sugkraroek i col. 1991). En tot això cal tenir en compte l'origen i l'estat de l'albúmina utilitzada en els experiments. El contingut d'àcids grassos de l'albúmina utilitzada condiciona, probablement, la seva eficàcia com a

acceptor de colesterol. Alguns autors utilitzen albúmina deslipidada (Ramsey i Westphal 1978) mentre que d'altres afirmen que és necessària la presència d'àcids grassos en les invaginacions hidrofòbiques de l'albúmina perquè aquesta pugui captar el colesterol (Bartholow i Geyer 1981). L'albúmina comercial sol tenir moltes impureses; donat que prové de sèrum o d'altres fluids biològics, pot anar acompanyada d'altres substàncies inhibidores (Oshio i col. 1986) o inductores de la RA (Ravnik i col. 1993). Ravnik i col. (Ravnik i col. 1990) han evidenciat que la proteïna de transferència lipídica 1 (LTP-1) és la responsable d'aquesta activitat. Això podria explicar el perquè de les diferències obtingudes en els percentatges de sortida de colesterol descrits tant en la literatura com en els nostres resultats.

També cal tenir en compte que les mostres utilitzades en alguns estudis són d'espermatozoides ejaculats (Davis i col. 1980; Langlais i col. 1988; Sugkraroek i col. 1991) mentre que en altres estudis són espermatozoides de l'epidídim (Davis i col. 1979; Go i Wolf 1985); això podria conferir a les mostres una susceptibilitat diferent per a la sortida de colesterol, ja que la composició de la superfície dels espermatozoides és diferent segons si l'espermatozoide és de l'epidídim o ja ha estat ejaculat. Efectivament, durant l'ejaculació s'adsorbeixen a la superfície dels espermatozoides glicoproteïnes del plasma seminal (vegeu introducció, apartat 1.4), que probablement dificulten la sortida de colesterol (Martínez i Morros 1996). Aquest fet no sempre és tingut en compte a l'hora d'interpretar els resultats.

La sortida de colesterol depèn de les dimensions de la molècula acceptora. L'eficiència en la inducció de sortida del colesterol és més gran quan l'acceptor és una molècula petita que quan és una macromolècula (Davidson i col. 1995). Les molècules petites poden arribar fàcilment, per difusió lliure, fins a la mateixa superfície de la bicapa lipídica, on poden col·lisionar amb molècules de colesterol. En canvi, les macromolècules acceptores de colesterol, com l'albumina i les lipoproteïnes veuen impedit el seu accés a la bicapa lipídica per les proteïnes adsorbides a la superfície de la membrana plasmàtica. Així, les molècules petites tenen una velocitat de difusió lliure i una accessibilitat a la superfície de la bicapa molt més gran que les macromolècules. Tanmateix, cada macromolècula pot contenir un número més gran de molècules de colesterol que una molècula petita (Rodríguez i col. 1997).

5.1.3 Efecte de la β CD

Està àmpliament descrit que es pot aconseguir una sortida massiva de colesterol de les membranes de diversos tipus de cèl·lules, com els eritròcits (Irie i col. 1992), les cèl·lules neuronals (Kojro i col. 2001), els adipòcits (Prattes i col. 2000), etc. després d'incubar les cèl·lules amb β CD. S'aconsegueix un intercanvi ràpid de colesterol ($t_{1/2}$ de menys d'un minut) dels dels eritròcits cap a la β CD (Irie i col. 1992), fet que contrasta amb l'intercanvi molt més lent des d'aquestes cèl·lules cap a proteïnes complement del sèrum o cap a lipoproteïnes aïllades ($t_{1/2}$ d'1 a 8 hores) (Phillips i col. 1987). Aquests precedents permeten esperar que la β CD sigui

una molècula de gran utilitat com a acceptora de colesterol de les membranes dels espermatozoides.

Els nostres resultats (vegeu 4.1.3.1) indiquen que, en β CD 2 mM, el 30% del colesterol surt de les membranes dels espermatozoides, però aquesta concentració no és capaç d'induir RA, almenys en un període d'incubació de 150 min. Només quan surt més colesterol, prop del 50%, les membranes són susceptibles d'iniciar tots els canvis que condueixen a la capacitat i RA. Aquests resultats estan d'acord amb Ehrenwald i col. els quals no detecten RA després d'una sortida de colesterol del 30%, incubant els espermatozoides durant 90 minuts amb liposomes com a acceptor de colesterol (Ehrenwald i col. 1988a). Quan incubem els espermatozoides amb β CD 4 mM, la sortida de colesterol arriba a ser del 50% i s'observa més de la meitat del percentatge màxim de RA. Una sortida de colesterol d'entre el 50% i el 65% és capaç d'induir importants percentatges de RA, entre un 35% i un 47%. Aquests valors es troben dins del rang de percentatge de RA que s'acostuma a obtenir en els assajos de RA *in vitro* (30%-50%) (Somanath i col. 2000). La forma aparentment sigmoïdal de la corba de percentage de RA *versus* concentració de β CD (Figura 27) es podria interpretar com un efecte cooperatiu en el qual esdeveniments moleculars primerencs, en una àrea restringida de la membrana dels espermatozoides, podrien facilitar canvis posteriors en una zona més ampla, induint un augment de RA per un petit increment de concentració de β CD.

Diversos autors han demostrat, especialment en el cas dels eritròcits, que la sortida de colesterol induïda per la β CD té lloc amb una unió negligible a la membrana (Ohtani i col. 1989). La β CD, soluble en aigua,

actua com un compartiment localitzat a la fase aquosa, capaç d'acceptar colesterol. Així, es produeix el repartiment del colesterol entre la bicapa lipídica i el compartiment aquós, mentre que els fosfolípids romanen inalterats. Efectivament, els nostres resultats (vegeu 4.1.3.5) demostren que la sortida de colesterol no va acompanyada de sortida de fosfolípids i per tant indiquen que s'ha preservat la integritat de les membranes. Això demostra que l'augment de RA és una conseqüència de la sortida de colesterol.

La cinètica de la sortida de colesterol induïda per la β CD (vegeu Figura 29), amb un temps de vida mitjana ($t_{1/2}$) al voltant de 6 minuts, és molt més ràpida que la induïda per la presència de sèrum d'ovelles en estre (Huneau i col. 1994), o de sèrum humà o de fluid fol·licular de dones (Langlais i col. 1988), que tenen vides mitjanes de l'ordre d'una hora. Les molècules petites acceptores de colesterol presenten cinètiques de captació molt més ràpides que no pas les macromolècules (Rothblat i Phillips 1982). Aquesta pèrdua ràpida de colesterol per part de les membranes de l'espermatozoide, que sembla seguir una exponencial decreixent (Figura 29) contrasta amb la corba sigmoïdal que sembla seguir l'increment de la RA (Figura 30). Després de 30 minuts d'incubació en presència de 8 mM de β CD tot el colesterol intercanviable ha sortit de les membranes, mentre que no s'observa cap increment significatiu de la RA. Es necessiten incubacions de 3 a 4 hores per tal d'assolir el màxim percentatge de RA. Probablement, aquest temps de decalatge entre ambdós fenòmens sigui necessari perquè es produeixin esdeveniments diversos i complexos, que culminaran amb en la fusió de membranes característica de la RA. De tota manera, es presentarà

una discussió més àmplia després d'analitzar altres resultats del nostre estudi (vegeu apartat 5.3).

La sortida de colesterol havia estat proposada com a un dels esdeveniments inicials que condueixen a la RA (Go i Wolf 1985; Langlais i Roberts 1985; Zarintash i Cross 1996). El nostre estudi cinètic, tant de la sortida de colesterol com de l'increment de RA, demostra que la sortida massiva de colesterol constitueix, per sí sola, un disparador de la RA..

5.1.4 Efecte de l'heparina

S'ha demostrat, tant *in vivo* com *in vitro*, que l'heparina o els glicosaminoglicans participen en la capacitació dels espermatozoides (Parrish i col. 1988; Parrish i col. 1989), probablement degut a la seva habilitat per segrestar les *coating proteins* (vegeu 1.4) (Parrish i col. 1988). Alguns autors han suggerit que la capacitació dels espermatozoides de boví per glicosaminoglicans inclou l'eliminació de les proteïnes de descapacitació del plasma seminal (Oliphant i col. 1985; First i Parrish 1987; Miller i col. 1990). La sortida d'aquestes proteïnes sembla ser un requisit previ per a la reacció acrosòmica. De fet, els nivells de colesterol que es poden eliminar dels espermatozoides epididimals són de tres a quatre vegades més alts que en el cas d'espermatozoides ejaculats (Ehrenwald i col. 1988a).

En el nostre treball (vegeu 4.1.4.1), l'addició d'heparina al medi de capacitació no ha donat lloc a cap efecte sinèrgic sobre la sortida de colesterol ni sobre la RA induïda per β CD. Aquest resultat indica que l'eliminació de les *coating proteins* no és un requeriment necessari perquè la β CD pugui captar el colesterol.

5.1.5 Efecte de la progesterona

La progesterona, hormona esteroidea present en el tracte genital femení, és coneguda per ser un inductor de la RA (Parinaud i col. 1992; Rathi i col. 2003). El receptor de la progesterona es troba a la membrana plasmàtica (Cheng i col. 1998) dels espermatozoides de boc (Somanath i Gandhi 2002). La seva presència en la membrana depèn de l'estat de maduració dels espermatozoides (Sirivaidyapong i col. 2001). El mecanisme d'acció de la progesterona proposat per Somanath i col. postula que un cop els espermatozoides són dipositats en el tracte genital femení, la progesterona s'uneix als seus receptors, presents en la membrana plasmàtica, induïnt la RA i alliberant els enzims hidrolítics que obririen el camí cap a la zona pel·lúcida de l'oòcit (Somanath i col. 2000).

En el nostre estudi (vegeu 4.1.5.1), la RA induïda per la incubació de β CD 8 mM durant 5 min és significativa i corrobora els resultats anteriors (vegeu apartat 4.1.5.1 i Figura 33) en el sentit que la sortida de colesterol constitueix, per sí sola, un disparador de la RA. En canvi, els espermatozoides incubats amb progesterona, però sense cap tractament previ amb β CD, presenten un molt baix percentatge de RA. D'altra banda, els espermatozoides incubats amb progesterona després d'haver estat tractats amb β CD presenten un percentatge de RA més elevat que en absència de l'hormona (Figura 33). Això indica que l'addició de progesterona indueix RA únicament quan el colesterol no esterificat ha estat eliminat de les membranes dels espermatozoides. Aquesta conclusió és la mateixa a la que arriben Zarintash i Cross, els quals indueixen sortida de colesterol en espermatozoides humans utilitzant BSA com a molècula acceptora de

colesterol (Zarintash i Cross 1996). El conjunt d'aquests resultats podria indicar que la sortida de colesterol, i l'acció de la progesterona present en el tracte genital femení, cooperen en els esdeveniments complexos i encara poc coneguts que desemboquen en la RA.

5.1.6 Models explicatius dels diferents mecanismes d'eliminació del colesterol de les membranes

El mecanisme que explica la sortida de colesterol de les membranes ha estat descrit, a nivell molecular, utilitzant membranes artificials (liposomes). Les molècules de colesterol surten de la interfície lípid-aigua i difonen, per difusió lliure, a través de la fase aquosa fins que col·lionen amb una partícula acceptora (Phillips i col. 1987; Johnson i col. 1991).

La sortida de colesterol de moltes membranes biològiques de mamífer pot ser explicada, en part, per l'anterior mecanisme. No obstant, en aquest cas, el procés és més complex. Les glicoproteïnes de la regió del glicocàlix retenen una capa d'aigua immobilitzada al voltant de les cèl·lules, la qual no és present al voltant de les vesícules. Aquesta capa actua com una barrera de difusió entre la superfície de la cèl·lula i l'acceptor de colesterol. El colesterol, altament lipofílic, aviat satura la capa d'aigua circumdant, fins que una molècula acceptora entra en aquesta àrea i col·lionen. Per tant, la sortida de colesterol de les membranes involucra tant l'entrada d'un acceptor de colesterol en la capa d'aigua fixa com la col·lisió amb les molècules de colesterol (Rothblat i Phillips 1982; Phillips i col. 1987; Nemezc i col. 1988; Johnson i col. 1991).

En el nostre grup, assumim com a hipòtesi prèvia pel nostre treball, un mecanisme de sortida de colesterol de la membrana dels espermatozoides en condicions fisiològiques, proposat per Martínez i Morros (vegeu Figura 62) (Martínez i Morros 1996). La membrana plasmàtica del cap de l'espermatozoide exhibeix un glicocàlix gruixut, consistent en glicoproteïnes ancorades en la bicapa. Les característiques morfològiques d'aquest glicocàlix són diferents depenent de la regió de la membrana (regió acrosomal, postacrosoma ...) (Friend 1982). La capa de "*coating proteins*" (vegeu 1.4) que cobreix la zona del glicocàlix impossibilita l'entrada d'acceptors fisiològics, macromoleculars, de colesterol a la zona d'aigua immòbil i així interfereix la sortida de colesterol de la membrana plasmàtica de l'espermatozoide. Tanmateix, les esmentades proteïnes es dissocien progressivament en unir-se amb glicosaminoglicans, durant el pas dels espermatozoides pel tracte genital femení, o bé amb l'heparina en incubacions *in vitro*. Un cop les "*coating proteins*" són eliminades de la superfície de l'espermatozoide, els acceptors de colesterol, com per exemple l'albumina, són lliures per col·lisionar amb la superfície de la bicapa lipídica, la qual constitueix el "*pool*" ric en colesterol, facilitant així la sortida ràpida d'aquest lípid de la membrana plasmàtica de l'espermatozoide.

En aquest context, com una extensió de l'esmentat model, nosaltres proposem el següent model per a la sortida de colesterol *in vitro* induïda per β CD (vegeu Figura 63). El pes molecular de la BSA és unes 60 vegades més gran que el pes molecular de la β CD. Això impediria a la BSA d'entrar a la capa de glicoproteïnes. Gràcies a la seva mida petita, la β CD podria penetrar a través de l'embolcall de glicoproteïnes i col·lisionar amb les molècules de colesterol.

Els resultats abans presentats (vegeu 4.1.3) demostren que la β CD és extremadament eficient captant el colesterol de les membranes dels espermatozoides, inclús sense cap altre tractament associat ni cap altre inductor com seria l'heparina (vegeu 4.1.4.1). A més a més, tampoc hem trobat cap efecte sinèrgic en la inducció de la RA en addicionar heparina al medi en presència de β CD. El model aquí proposat permetria explicar perquè l'eliminació de les "coating proteins" no és condició necessària perquè la β CD capti el colesterol.

Del conjunt dels resultats de l'apartat 4.1.3 s'en pot concloure que la β CD indueix tant la sortida de colesterol com la RA *in vitro*. Aquest fet suggereix que la sortida massiva de colesterol és un dels primers esdeveniments que dispararia la capacitació i la RA.

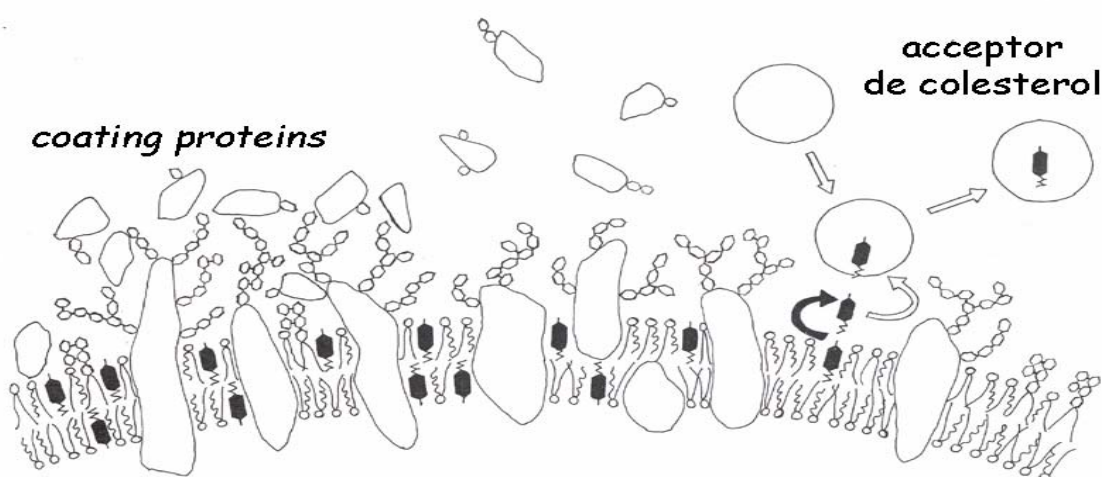


Figura 62 Model hipotètic de la sortida de colesterol en la capacitació d'espermatozoides humans (Martínez i Morros 1996).

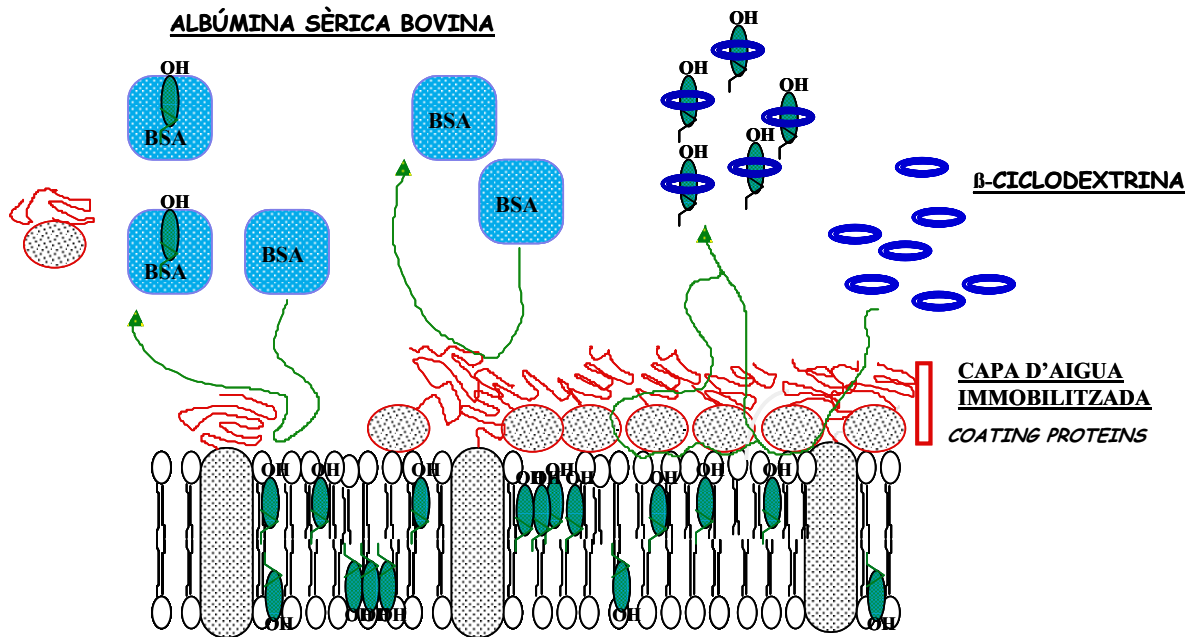


Figura 63 Model hipotètic del mecanisme de sortida del colesterol de les membranes dels espermatzoides, induït per β CD.

5.2 Estudis biofísics de les membranes dels espermatzoides mitjançant anisotropia de fluorescència

5.2.1 Comportament termotròpic de liposomes provinents d'extractes lipídics de d'espermatozoide

En els ajustos matemàtics de les corbes de transició de fase dels liposomes provinents d'extractes lipídics d'espermatozoide (vegeu 4.2.2.2 i Taula 5), hi ha 3 paràmetres que canvien d'una manera significativa com a conseqüència de l'incubació amb β CD: T_m , r_2 i ΔH_{vH} . La T_m disminueix en 5°C indicant, per tant, que les membranes es fluidifiquen. Com més baixa és la T_m més dèbils són les forces de van der Waals entre les cues hidrofòbiques

dels fosfolípids (Gennis 1989) (vegeu 1.7.5). La disminució en 5°C de la T_m indica, per tant, que la bicapa es fluidifica. Una davallada de la T_m , com a conseqüència d'una sortida de colesterol, està d'acord amb els resultats de McMullen i col. (McMullen i col. 1993), els quals troben que la incorporació de colesterol augmenta progressivament la T_m de fosfatidilcolines disaturades amb 16 o menys carbonis. Aquest tipus de cadenes d'àcids grassos són els fosfolípids més abundants en la membrana plasmàtica dels espermatozoides de boc de la *cauda* de l'epidídim (Rana i col. 1991).

El paràmetre d'anisotropia r_2 també decreix, des de 0.056 a 0.032. Una disminució de l'anisotropia de fluorescència indica un increment en la mobilitat rotacional dels fosfolípids i un augment del desordre en les cadenes acíliques dels fosfolípids (Lentz 1993). Per tant, aquest canvi també és indicatiu d'un increment de la fluïdesa de membrana induïda per la sortida de colesterol de les membranes dels espermatozoides. La manca de canvi del paràmetre d'anisotropia r_1 , a baixes temperatures (vegeu Figura 46 i Taula 5), també està d'acord amb resultats previs amb membranes model. Utilitzant anisotropia de fluorescència s'ha demostrat, per liposomes amb lípids amb diferents regions interfacials o diferents caps polars, que un enriquiment en colesterol no causa canvis en la fase gel, però sí que indueix un increment considerable de l'anisotropia en la fase cristall-líquid (Antunes-Madeira i col. 1994; Bhattacharya i Haldar 2000) (vegeu també Figura 9).

Si els liposomes s'haguessin preparat amb la mescla de colesterol i un sol tipus de fosfolípid, hom esperaria que la posterior eliminació de colesterol induís un estretament de la transició i, per tant, un increment de

la ΔH_{vH} (Heyn i col. 1981). Per tant, l'eixamplament de la transició obtingut per nosaltres després de la incubació amb β CD hauria ser conseqüència de la complexitat de la composició lipídica dels extractes lipídics d'espermatozoide.

5.2.2 Comportament termotròpic d'espermatozoides sencers

5.2.2.1 *Espermatozoides control*

Els nostres estudis de comportament termotròpic (vegeu 4.2.2.3) han demostrat que, en les nostres condicions de treball, les membranes d'espermatozoides control sencers de boc segueixen una transició de fase bimodal. Efectivament, apareixen dues transicions de fase clarament definides i separades, amb valors de T_m marcadament diferents, 15°C i 37°C .

Pel que fa als antecedents bibliogràfics en espermatozoides control, trobem grans diferències entre els resultats obtinguts. Utilitzant espectroscòpia d'infraroig amb transformada de Fourier (FTIR), Drobnis i col. varen estudiar el comportament termotròpic d'espermatozoides intactes en el rang de temperatures de 0°C - 30°C i van trobar una única transició de fase, amb una T_m al voltant dels 18°C (Drobnis i col. 1993). Amb la mateixa tècnica, Zeron i col. també van trobar una sola transició de fase amb una T_m al voltant de 13°C en espermatozoides bovins intactes (Zeron i col. 2002). Mitjançant anisotropia de fluorescència del DPH, Carlini i col. també van detectar una sola transició de fase que s'extenia des de 10°C fins a 45°C , en membranes d'espermatozoide humà (Carlini i col. 1997).

Wolf i col. també van fer estudis del comportament termotròpic de liposomes provinents de lípids de membrana del cap d'espermatozoides de be utilitzant calorimetria diferencial d'escombratge (DSC) (Wolf i col. 1990). Ells varen obtenir dues transicions de fase, una transició complexa extesa entre 10°C i 35°C, centrada prop de 26°C i una altra a 60°C, temperatura situada en el límit de l'interval estudiat per nosaltres.

Crowe i col. també van estudiar transicions de fase en espermatozoides de boc intactes utilitzant FTIR (Crowe i col. 1989). Encara que aquests autors descriuen la corba obtinguda com a una sola transició centrada a 21°C, un examen visual d'aquesta corba suggereix la presència de dues transicions separades, una centrada a 15°C i l'altra al voltant de 30°C.

Holt i North varen detectar tres transicions de fase en liposomes provinents de membrana plasmàtica aïllada d'espermatozoides ejaculats de be, utilitzant la funció d'Arrhenius en la polarització de fluorescència del DPH (Holt i North 1986). Dues d'aquestes temperatures de transició de fase coincideixen amb les trobades per nosaltres: 16.4°C (nosaltres 14.9°C) i 35.67°C (nosaltres 37.4°C). No obstant ells també van trobar una tercera temperatura de transició a 26.4°C que nosaltres no hem detectat en els espermatozoides de boc.

Potser no és d'estranyar aquesta diversitat de resultats de la bibliografia. Moltes de les diferències serien esperables entre espermatozoides de diferents espècies de mamífer. D'altra banda, les tècniques emprades són diverses i presenten diferències pel que fa a la seva sensibilitat, velocitat en el canvi de temperatura, etc. En aquest sentit cal destacar que la nostra metodologia de treball ens ha permès obtenir

paràmetres del comportament termotròpic amb una elevada fiabilitat: el nombre de punts que defineixen les corbes obtingudes és d'1.5 punts/°C. L'anàlisi estadística de 6 experiments prèviament ajustats utilitzant càlculs teòrics, ens ha permès obtenir valors altament fiables dels paràmetres matemàtics que defineixen el comportament termotròpic. Aquest tipus de tractament estadístic i matemàtic no havia estat abans realitzat en cap dels treballs anteriors.

Altres autors també han trobat transicions de fase bimodals en membranes d'eritròcits humans (Hall i col. 1991; Wolkers i col. 2002), o fins i tot transicions de fase més complexes en plaquetes humanes intactes (Tsvetkova i col. 2000).

El fet que, en espermatozoides control, haguem detectat dues transicions clarament diferenciades, indica que hi ha com a mínim dos dominis lipídics, que anomenarem "domini 1" i "domini 2". Aquests dominis haurien de diferir fortament en quant a les seves propietats físiques, fet que podria ser degut a diferències en la saturació de les cadenes d'àcids grassos, en la llargada d'aquestes cadenes, en el cap polar i la seva càrrega, i en el contingut de colesterol (vegeu 1.7.5) (Gennis 1989). Potser és una mica prematur determinar quina és la raó de la bimodalitat del comportament termotròpic observat en els nostres estudis. Tanmateix, tenint en compte la composició lipídica coneguda de les membranes de l'espermatozoide de boc (vegeu 1.6), la transició a prop de 15°C ("domini 1") es podria atribuir a microdominis de membrana rics en lípids insaturats, mentre que la transició a prop de 40°C ("domini 2") podria correspondre a regions de la membrana més riques en lípids saturats, incloent esfingolípid i, inclús, probablement

lípidis disaturats. No es pot excloure la presència de més de dos tipus de dominis, però el comportament termotròpic d'aquests altres dominis podria sobreposar-se a les dues transicions observades.

En una cèl·lula polaritzada, com és el cas de l'espermatozoide, aquest comportament termotròpic complex podria ser directament atribuït a les grans regions morfològiques de la membrana: acrosoma, regió equatorial i postacrosoma en el cap, peça intermèdia i peça principal en la cua. Probablement hi ha barreres funcionals de difusió entre elles que impedirien la barreja de lípidis (Wolf i col. 1986a; Wolf i col. 1986c; Wolf 1987b).

No obstant, també es podrien donar subregionalitzacions dins d'aquelles grans regions morfològiques, donant lloc a microdominis lipídics rígids, que podrien coexistir amb microdominis fluids (Wolf 1987a; Wolf 1987b; Wolf 1995). Mentre que els espermatozoides de la majoria de mamífers presenten una alta proporció d'àcids grassos poliinsaturats, els espermatozoides de boc tenen una baixa proporció d'insaturats (29%). La fosfatidilcolina (PC) forma el 36% del total de lípidis de la membrana plasmàtica de l'espermatozoide de boc i el 55% de les seves cadenes d'àcids grassos són saturades. La fosfatidiletanolamina (PE) forma el 25% del total de lípidis i conté proporcions encara més altes de cadenes d'àcids grassos saturats (72%). Està ben establert que la PE, per a una determinada composició de cadenes acíliques, presenta unes T_m més altes que la PC (Blume 1980). L'esfingomielina forma l'11% del total de lípidis d'aquestes membranes i també té un contingut molt alt en àcids grassos saturats (82%) (Rana i col. 1991). L'esfingomielina és coneguda per exercir un efecte

rigidificant en les biomembranes i s'ha demostrat que interactua preferentment amb el colesterol, donant lloc a dominis lipídics més ordenats o "*rafts*" (Brown i London 1998; Brown 1998; Rietveld i Simons 1998; Barenholz i Thompson 1999; Slotte 1999; Wolf i col. 2001; Wolfe i col. 2001; Ohvo-Rekila i col. 2002; Ramstedt i Slotte 2002). S'ha proposat que l'esfingomielina podria ser el lípid que determinés la distribució dels esterols en les membranes dels espermatozoides (Cross 2000). Nosaltres suggerim que els lípids insaturats podrien separar-se d'altres lípids per formar una fase fluïda, i els lípids restants, majoritàriament compostos per fosfolípids disaturats, tindrien temperatures de transició de fase més altes. El colesterol afavoriria la separació de fases dels constituents de la membrana en microdominis rics en àcids grassos insaturats i en microdominis rics en àcids grassos saturats, amb una distribució desigual del colesterol (Brzustowicz i col. 2002).

Les diferències entre els nostres resultats, utilitzant cèl·lules senceres, i estudis a partir de membranes isolades es poden explicar perquè l'aïllament de membranes de les cèl·lules comporta una pèrdua dels mecanismes que mantenen l'asimetria lipídica, o inclús alteracions significatives de les temperatures de transició; per tant, els resultats de membrana aïllada podrien no ser representatius de la situació que es dona en l'espermatozoide intacte (Cameron i col. 1983; Crowe i col. 1989; Ladha 1998). A més a més, s'ha de tenir en compte que, durant l'espermatogènesi, els espermatozoides perden la majoria dels seus orgànuls (1.2) (Holt 1984; Vos i col. 1994), i que més del 70% del total de membranes de l'espermatozoide correspon a membrana plasmàtica i membrana acrosomal (Sugkraroek i col. 1991). Per tant, les nostres corbes d'anisotropia de

fluorescència en espermatozoides sencers es poden atribuir principalment a les membranes plasmàtica i acrosomal, les quals estan directament implicades en la capacitació.

5.2.2.2 *Espermatozoides tractats amb β CD*

En els espermatozoides tractats amb β CD 8 mM també s'han trobat dues transicions amb un comportament termotròpic clarament diferenciat (vegeu Figura 48 i Taula 6) les quals també poden ser atribuïdes a dos grans dominis lipídics diferents, "domini 1" ($T_m = 19^\circ\text{C}$) i "domini 2" ($T_m = 46^\circ\text{C}$), que tindrien propietats físiques marcadament diferents. La sortida de colesterol produeix una davallada significativa del paràmetre r_3 i un increment en el rang d'anisotropia total ($r_3 - r_1$). Aquest fet indica un increment en la fluïdesa d'alguns microdominis de la membrana plasmàtica dels espermatozoides. A més a més també hi ha un canvi en "l'alçada" relativa o rang d'anisotropia relatiu de les dues transicions ($r_2 - r_1$; $r_3 - r_2$): el rang d'anisotropia de la primera transició ($r_2 - r_1$) s'expandeix significativament, mentre que el rang de la segona transició ($r_3 - r_2$) es redueix.

Els esmentats efectes de la sortida de colesterol es poden interpretar de dues maneres:

Hipòtesi 1: L'increment en "l'alçada" o rang d'anisotropia de la primera transició ($r_2 - r_1$) és clarament degut a una davallada dràstica del valor d'anisotropia de la fase fluïda del "domini 1" (r_2). Tal com s'ha explicat en l'apartat 1.7.5 (vegeu Figura 9), això indicaria una important sortida de colesterol del "domini 1" (Antunes-Madeira i col. 1994; Bhattacharya i

Haldar 2000). Ha estat proposat que el colesterol dels dominis fluids de les membranes biològiques és la font més probable per a la sortida de colesterol induïda per les ciclodextrines (Schroeder i col. 1991; Simons i Ikonen 2000).

Cal tenir en compte que cada valor d'anisotropia de les corbes de la Figura 45 i de la Figura 46, per a una temperatura donada, s'ha d'entendre com el resultat de les contribucions de dos "dominis" que coexisteixen. Per tant, seria possible que l'expansió del rang d'anisotropia $r_2 - r_1$ contribuís a la reducció del rang $r_3 - r_2$. No obstant, aquesta hipòtesi no és suficient per explicar altres canvis, com els canvis en ΔH_{VH} , induïts per la sortida de colesterol.

Hipòtesi 2: "L'alçada" de cada transició podria respondre a la grandària relativa de cada "domini" en la membrana de l'espermatozoide sencer. En els espermatozoides control, la segona transició ($r_3 - r_2$) és més gran que la primera ($r_2 - r_1$); això podria significar que el "domini 2", més rígid, seria més abundant en les membranes dels espermatozoides control. Després de la sortida de colesterol, part dels microdominis que participen en el "domini 2", rígid, es fluidificarien adquirint una T_m més baixa. Això reduïria "l'alçada" del "domini 2" ($r_3 - r_2$) i augmentaria la del "domini 1" ($r_2 - r_1$).

Així, per explicar els efectes de la sortida de colesterol no es podria excloure cap de les dues hipòtesis ni tampoc que hi hagués una contribució de les dues alhora.

És conegut que el contingut en colesterol de les membranes de les cèl·lules de mamífer té un efecte substancial en les interaccions lípid-lípid (Brown i London 1998; Tsvetkova i col. 2000). Se sap que el colesterol altera dramàticament l'organització en dominis lipídics de les membranes, depenent de la seva concentració. Recentment s'ha demostrat que la sortida de colesterol induïx la segregació de dominis o la separació de fases en la membrana plasmàtica de moltes cèl·lules de mamífer (Hao i col. 2001). En les membranes de les plaquetes, el colesterol podria estabilitzar els límits entre microdominis; així la sortida de colesterol portaria a la coalescència de microdominis que donarien lloc a macrodominis (Tsvetkova i col. 2000). De la mateixa manera, la sortida de colesterol dels espermatozoides podria induir una reorganització en la segregació lateral dels lípids. Aquesta redistribució lipídica podria donar lloc a dominis més fluïds i fusogènics, requerits per la fusió de membranes durant la reacció acrosòmica (Ehrenwald i col. 1988a).

5.3 Discussió sobre les conseqüències biològiques de la sortida de colesterol

La capacitació és un esdeveniment de cabdal importància, ja que si els espermatozoides no estan capacitats no hi pot haver fecundació (Flesch i Gadella 2000). Havia estat proposat que la sortida de colesterol de les membranes és una etapa requerida per a la capacitació i reacció acrosòmica dels espermatozoides (Lin i Kan 1996; Zarintash i Cross 1996; Visconti i col. 2002; Nimmo i Cross 2003). Els nostres estudis demostren, almenys *in vitro*, que aquesta sortida de colesterol és suficient per a disparar la RA,

però amb un decalatge d'entre 2-3 hores entre ambdós fenòmens. Quins són els esdeveniments que tenen lloc durant aquest temps és encara poc conegut.

Diversos autors han proposat hipòtesis sobre les conseqüències biològiques de la sortida de colesterol de la membrana dels espermatozoides. La sortida de colesterol explicaria les alteracions observades en la fluïdesa de membrana dels espermatozoides (Wolf i col. 1986a; Visconti i col. 1999). Un increment de la fluïdesa de la membrana plasmàtica permetria un increment de la permeabilitat d'aquesta membrana cap al Ca^{2+} (Wolf i col. 1986a; Rathi 2001) fet que es considera com un requisit previ per a que la reacció acrosòmica tingui lloc. Un increment de la concentració de Ca^{2+} podria disparar diferents vies involucrades en la reacció acrosòmica, per exemple la generació de diacilglicerol (DAG). El DAG podria estimular la fosfolipasa A_2 , que és també dependent de Ca^{2+} (Roldan i Mollinedo 1991). L'activació de la fosfolipasa A_2 donaria lloc a la formació de lisofosfolípids, els quals són coneguts per ser altament fusogènics. En resum, nivells baixos de colesterol probablement desestabilitzarien la membrana plasmàtica, la qual podria fàcilment fusionar-se amb la membrana acrosomal externa.

Els possibles canvis en el contingut de colesterol de la membrana plasmàtica de la peça intermèdia i de la peça principal podrien incrementar la mobilitat lateral d'alguns components de la membrana, fet compatible amb la hiperactivació dels espermatozoides durant la capacitació (Lin i Kan 1996).

Els resultats de l'apartat 4.1.3.4 (vegeu Figura 29 i Figura 30) demostren que després d'1 hora d'incubació amb β CD no s'indueix RA. Només al cap de 3-4 hores d'incubació, el 30% de les cèl·lules sofreixen la RA. En els experiments d'anisotropia de fluorescència (vegeu 4.2.2.3) els espermatozoides han estat incubats amb β CD durant només 1 hora. Així doncs, els canvis observats en el comportament termotròpic no correspondrien encara a una desestabilització de les membranes de l'espermatozoide. En tot cas, aquests canvis fan que la membrana esdevingui més làbil a posteriors esdeveniments, disparats per una sortida de colesterol inicial, i que acabaran amb la fusió de membranes durant la RA. Aquests esdeveniments previs a la RA, definits com a capacitació, són encara molt poc coneguts. Fins aquí, els nostres resultats contribueixen a definir millor el paper del colesterol en la capacitació: alterar considerablement la fluïdesa de membrana i l'organització lipídica. Quines regions de l'espermatozoide estan involucrades en la reorganització lipídica que té lloc com a conseqüència de la sortida de colesterol, és l'aspecte que s'ha investigat a continuació.

5.4 Detecció de dominis lipídics

5.4.1 Discussió sobre l'ús de merocianina 540

La merocianina 540 (MC 540) és una sonda fluorescent sensible a l'empaquetament dels lípids de la bicapa (Williamson i col. 1983) i és coneguda per distribuir-se preferentment en dominis on els lípids tenen major fluïdesa. Així, en els dominis en fase cristall-líquid, la seva intensitat

de fluorescència es veu altament incrementada (Williamson i col. 1983). Experiments amb membranes artificials demostren que aquesta sonda s'uneix preferentment a liposomes preparats a partir de lípids insaturats. De la mateixa manera, la MC 540 té diferents afinitats per les regions riques i pobres en colesterol i s'uneix preferentment a dominis lliures de colesterol (Humphries i Lovejoy 1983; Sieber 1987; Bernik i Disalvo 1993), mentre que l'addició de més d'un 20% molecular de colesterol en liposomes en fase fluïda exclou la MC 540 de la membrana i, per tant, hi ha una davallada de la fluorescència (Williamson i col. 1983).

L'ús de la MC 540 com a sonda per a detectar canvis en el desordre de dominis lipídics ha estat ben establert. Aquesta sonda s'ha utilitzat ampliament com a sensor d'esdeveniments moleculars relacionats amb l'empaquetament de lípids, tant en sistemes model de membranes com en cèl·lules senceres (Williamson i col. 1983; Sieber 1987; Bernik i Disalvo 1993; Langner i Hui 1993; Stillwell i col. 1993; Langner i Hui 1999).

Diversos autors han utilitzat la MC 540, en estudis per microscòpia confocal, per a detectar canvis en l'organització dels dominis lipídics de l'espermatozoide durant la maduració epididimal (Schlegel i col. 1986; Sivashanmugam i Rajalakshmi 1997) o bé durant la capacitació induïda amb bicarbonat (Harrison i col. 1996; Flesch i col. 2001). Altres autors han utilitzat la MC 540, en estudis per citometria de flux, per tal de detectar canvis en la fluïdesa de les membranes d'espermatozoides durant la capacitació, també per bicarbonat (Harrison i Gadella 1995; Harrison i col. 1996; Flesch i col. 1999; Gadella i Harrison 2000; Harrison i Miller 2000;

Rathi i col. 2001) i en estudis de criopreservació (Green i Watson 2001; Kavak i col. 2003; Pena i col. 2004).

5.4.2 Discussió dels resultats obtinguts per microscòpia confocal

5.4.2.1 Discussió sobre les imatges obtingudes per a espermatozoides control

Gràcies a la diferent afinitat de la MC 540 per les diverses regions de la membrana, hem pogut definir uns patrons de marcatge (vegeu 4.3 i Figura 51) en la població d'espermatozoides estudiada. Els patrons més freqüents, A, B, i C, es caracteritzen per un marcatge preferent de l'acrosoma i de la zona equatorial, mentre que en el patró D, menys freqüent, l'acrosoma no es marcava.

En estudis anteriors per d'altres autors ja s'havien descrit patrons de marcatge de la MC 540 en espermatozoides. Tanmateix, cal destacar, que en el present estudi s'ha quantificat la intensitat de fluorescència de cada regió de cadascun dels 368 espermatozoides estudiats. Això ens ha permès de dur a terme un estudi estadístic acurat, tant de les freqüències d'aquests patrons (Figura 53) com de la distribució d'intensitats de fluorescència entre regions (Figura 54).

Recordem que un marcatge intens indica fluïdesa o bé absència de colesterol (vegeu 5.4.1), mentre que un baix marcatge indica rigidesa o bé abundància de colesterol.

Pel que fa al cap de l'espermatozoide, en general, en els patrons majoritaris A, B i C, s'observa una major fluïdesa a tot l'acrosoma i al segment equatorial, mentre que la regió postequatorial és més rígida. Aquesta regionalització de la MC 540 és similar a la trobada en l'espermatozoide de mico (Sivashanmugam i Rajalakshmi 1997). En l'espermatozoide del conillet d'Índies també s'ha observat fluorescència en l'acrosoma i absència de marcatge en el postacrosoma (Bearer i Friend 1981). Utilitzant la tècnica de recuperació de la fluorescència després de fotoblanqueig (FRAP) per mesurar la difusibilitat de l'anèleg lipídic diIC₁₆ en la membrana plasmàtica de l'espermatozoide de be, s'ha trobat també que la fluïdesa de la part anterior del cap és significativament major que la de la zona postequatorial (Wolf i Voglmayr 1984).

Probablement, aquesta fluïdesa, especialment la de la zona apical i la de la zona equatorial, estigui relacionada amb la funció que hauran de portar a terme més endavant aquestes regions. La zona apical és on tindrà lloc la fusió de membranes plasmàtica i acrosomal externa durant la RA (Flesch i Gadella 2000). El segment equatorial és per on tindrà lloc la fusió de membranes entre la membrana plasmàtica de l'espermatozoide i la membrana plasmàtica de l'oòcit o oolema (Flesch i Gadella 2000). És a dir, aquestes regions de la membrana que ara són més fluïdes, són les que probablement, en el seu moment, esdevindran més fusogèniques. En canvi, comparativament, la regió postequatorial apareix, en els patrons majoritaris, com menys fluïda. Aquesta regió no participa en cap fusió de membranes i ha estat proposat que s'hauria de mantenir rígida i estable durant la RA i fins a la unió de l'espermatozoide amb l'oòcit (Bearer i Friend 1982; Ahuja 1985).

Pel que fa a la cua, tots quatre patrons presenten un marcatge molt contrastat: mentre la peça intermèdia és la regió més marcada de tot l'espermatozoide, el flagel n'és la menys marcada. L'intens marcatge de la peça intermèdia s'ha d'atribuir a una elevada fluïdesa, ja sigui de la seva membrana plasmàtica, ja sigui de les membranes de les mitocòndries, localitzades en aquesta zona. Essent la MC 540 una molècula lipofílica amb càrrega negativa deguda al seu grup sulfonat, seria d'esperar que s'unís només a la monocapa externa de la bicapa lipídica de la membrana plasmàtica. No obstant, estudis recents han mostrat que la MC 540 podria internalitzar-se, ja que s'ha observat també localitzada en les mitocòndries de cèl·lules murines de leucèmia mieloide (Chen i col. 2000). Donat el molt baix contingut en colesterol de les membranes de les mitocòndries (Yeagle 1985), és molt probable un elevat marcatge per MC 540 en aquestes membranes.

5.4.2.2 Discussió sobre les imatges obtingudes per a espermatozoides tractats amb β CD

5.4.2.2.a Increment de la fluïdesa en l'acrosoma

Pel que fa al patró A , amb una marcatge homogeni en tot l'acrosoma (Figura 51), la intensitat de fluorescència del conjunt de l'acrosoma és significativament més alta després de la sortida de colesterol (Figura 54). En el cas de l'espermatozoide de ratolí (Wolf i col. 1986a) i en el de be (Wolf i col. 1986b) la capacitat amb BSA també va donar lloc a un increment de la fluïdesa de la membrana de l'acrosoma. Un increment de la fluïdesa de membrana en la regió acrosomal, determinada també utilitzant

MC 540, va ser detectada en l'espermatozoide del conillet d'Índies durant la capacitació "in vitro" (Friend 1984; Fléchon 1985). Tanmateix, la freqüència del patró A disminueix significativament després de la incubació amb β CD durant 1 hora (Figura 53).

5.4.2.2.b Canvis de fluïdesa en la regió apical

La freqüència del patró C augmenta significativament durant la incubació de l'espermatozoide de boc amb β CD (Figura 53). Aquest patró C presenta un marcatge selectivament intens a la zona apical, mentre que la zona pre-equatorial s'observa menys marcada. Una possible explicació és que aquesta zona apical hagi subministrat part del colesterol que ha estat captat per la β CD. D'altra banda, Gadella i col. han suggerit un flux de fosfatidilcolina (PC) cap a la regió apical de l'espermatozoide de porc (Gadella i col. 1995). Com que les PC de l'espermatozoide de boc són riques en cadenes d'àcids grassos insaturats (Rana i col. 1991), aquest flux podria incrementar la fluïdesa de membrana en aquesta regió, facilitant així la seva posterior participació en el procés de fusió de membranes, durant la RA. De tota manera, cap d'aquestes dues interpretacions es pot excloure.

5.4.2.2.c Canvis de fluïdesa en la regió equatorial

Tal i com passa amb el patró C, la freqüència del patró B també incrementa significativament durant la incubació amb β CD durant 1 hora. Aquests dos patrons es caracteritzen per tenir la regió equatorial clarament delimitada per la seva intensa fluorescència. Després del tractament amb β CD, aproximadament un 76% (patrons B + C) dels espermatozoides presenten doncs, aquesta característica. Tal i com s'ha

descriu anteriorment aquesta regió està específicament involucrada en la fusió de la membrana plasmàtica de l'espermatozoide amb la membrana plasmàtica de l'oòcit (Yanagimachi 1994; Gadella i col. 1995). Friend i col·laboradors han proposat, per l'espermatozoide del conillet d'Índies, que la fluorescència de la MC 540, confinada inicialment a la regió apical de l'acrosoma, s'extendria cap a la regió equatorial després que les cèl·lules haguessin estat tractades amb tripsina o haguessin estat capacitades (Bearer i Friend 1981; Friend 1982).

Utilitzant també la microscòpia confocal altres autors han trobat increments de la fluorescència de la MC 540 en el cap de l'espermatozoide de porc durant la capacitació (Harrison 1996; Harrison i col. 1996; Flesch i col. 2001). Tanmateix, aquests autors no descriuen regionalització de la fluorescència com la que nosaltres observem. No obstant, cal tenir en compte que aquests autors induïen la capacitació amb BSA com a acceptor de colesterol i bicarbonat mentre que en el nostre treball s'ha utilitzat exclusivament la β CD, com a acceptor de colesterol. Segons els mateixos autors, en presència de bicarbonat altres mecanismes, com és un canvi en la composició de fosfolípids dels diferents dominis, participarien en el procés de la capacitació.

5.4.2.2.d Manteniment de la rigidesa de la regió postacrosomal

Després d'1 hora d'incubació amb β CD, la regió postacrosomal roman inalterada, amb una baixa fluïdesa. A la vista de la seva suposada funció, romandre estable durant la RA, seria d'esperar que mantingués la seva baixa fluïdesa (Bearer i Friend 1982).

5.4.2.2.e Increment de la fluïdesa en la peça intermèdia

Encara que el marcatge de la MC 540 és ja molt intens en la peça intermèdia en tots els patrons dels espermatozoides control, la incubació amb β CD durant 1 hora porta encara a un augment significatiu de la fluorescència en aquesta regió en els patrons A i C (Figura 54). Aquest canvi podria ser interpretat com un increment de la fluïdesa de les membranes de les mitocòndries localitzades en aquesta regió i que són la font de l'energia necessària per a la motilitat. En el cas de l'espermatozoide de ratolí (Wolf i col. 1986a) la capacitat "in vitro" amb BSA dona com a resultat un increment de la fluïdesa de membrana en les dues regions de la cua, la peça intermèdia i el flagel, fluïdesa requerida, potser, per a la hiperactivació (Yanagimachi 1994).

5.4.2.2.f Patró D

Tot i que el nostre tractament amb β CD s'ha efectuat només durant un temps d'incubació d'1 hora, temps situat just a l'inici de la RA massiva (vegeu 4.1.3.4), no es pot excloure que un petit percentatge de cèl·lules hagin experimentat ja aquest procés. Així, el patró D podria correspondre a espermatozoides que haguessin sofert la RA "espontània", tal i com s'havia dit a l'apartat 5.4.2.1.

5.5 Discussió dels resultats obtinguts per citometria de flux

Amb els estudis de citometria de flux es pretenia quantificar, a nivell poblacional, els canvis de fluïdesa de membrana induïts en els espermatozoides per la incubació en β CD 8 mM.

El canvi que s'observa al tractar les cèl·lules amb β CD 8 mM és un desplaçament de la corba de distribució de la fluorescència de la MC 540 cap a fluorescències més altes. D'una banda, la intensitat mitjana és més elevada, però d'altra banda observem també que la forma de la corba de distribució no es modifica, és a dir, no apareixen poblacions noves. Així, es pot afirmar que és, globalment, tota la població de cèl·lules vives que veu augmentada la seva fluïdesa, sense que, lògicament, es detectin aquí les diferències subtils entre patrons que la microscòpia confocal (vegeu 5.4) ens ha permès observar. Com ja s'ha vist a l'apartat 4.1.3.4 la incubació dels espermatozoides amb β CD 8 mM durant una hora dóna una ràpida sortida de colesterol. Per tant, els resultats observats per citometria de flux només poden ser deguts a la sortida de colesterol de les membranes dels espermatozoides.

Altres autors, del grup de Gadella i col·laboradors (Harrison i col. 1996; Gadella i col. 1999; Rathi 2001) han estudiat també, per citometria de flux i amb MC 540, els canvis de fluïdesa induïts per la capacitació (però utilitzant la BSA com a acceptor de colesterol). Aquests autors conclouen que, després de la incubació hi ha dues poblacions d'espermatozoides: una amb un marcatge per MC 540 més intens, que consideren capacitats, i l'altra, menys fluorescent, que consideren no capacitats. Tanmateix, aquests

autors mostren únicament, en els seus treballs, gràfics del tipus de la Figura 59, on no es pot distingir fàcilment el nombre de poblacions d'espermatozoides vius. Creiem que la representació del tipus de la Figura 60 és la més adequada per establir, sense ambigüitat, el nombre de poblacions diferents, que, en el nostre cas, ha resultat ser d'una sola tant en els controls com en les cèl·lules tractades, però amb diferència significativa entre elles.

En el diagrama de la Figura 59 podem observar que la població de cèl·lules mortes control presenta marcatge amb MC 540 clarament més intens que la població de cèl·lules vives. Per interpretar aquest fet cal recordar quin és el mecanisme acceptat per explicar el marcatge específic de les cèl·lules mortes per la sonda fluorescent Yo-Pro-1. Aquesta sonda marca específicament l'ADN. Donat que no pot travessar la bicapa lipídica, únicament pot arribar al nucli cel·lular si la membrana plasmàtica està deteriorada. Probablement el mateix deteriorament, en les cèl·lules mortes, possibilita una major entrada de MC 540 que explicaria el marcatge intens que hem observat en els espermatozoides control morts.

Encara que no era un dels objectius d'aquesta tesi, hem aprofitat la simplicitat experimental d'aquesta tècnica, i la rapidesa en la obtenció de resultats, per sondejar els canvis induïts en la fluïdesa de membrana per la incubació amb β CD durant períodes de temps més llargs, que cobrissin tota la cinètica de la RA: 2h i 3h (vegeu 4.1.3.4 i Figura 30). El notable increment de la intensitat mitjana de fluorescència de la població d'espermatozoides vius, induït per la incubació durant 2h, comparat amb l'increment observat a 1h (Figura 61) coincideix amb el període de màxim increment del

percentatge de RA (Figura 30). De la mateixa manera, el *plateau* observat entre 2-3h en la intensitat mitjana de fluorescència (Figura 61) correspondria pràcticament al final de la sigmoide que segueix la cinètica de la RA (Figura 30). Així doncs, podem afirmar que, encara que, la sortida de colesterol eliminable de les membranes s'ha realitzat ja en els primers 30 min d'incubació amb β CD8 mM, la fluïdesa de les membranes de la població d'espermatozoides augmenta significativament durant la primera hora, sense que hi hagi RA, i experimenta després un notable increment, que correspon a l'assoliment de la RA massiva.

Si bé la fluïdificació de les membranes durant la primera hora era esperable i, formava part de la nostra hipòtesi de treball, explicar la ulterior fluïdificació depassa probablement l'abast d'aquesta tesi.

6 CONCLUSIONS

Conclusions

1. S'ha posat a punt un conjunt de metodologies per a la determinació dels nivells de colesterol i de fosfolípids de les membranes dels espermatozoides de boc, per a l'estudi del seu comportament termotròpic, per a la visualització i quantificació de macrodominis lipídics i per a la caracterització de la població d'espermatozoides vius implicada en aquests canvis.
2. La β -ciclodextrina (β CD) és una molècula que permet l'eliminació, controlada i reproducible, del colesterol no esterificat de les membranes dels espermatozoides. Aquesta sortida de colesterol no va acompanyada de sortida de fosfolípids i, per tant, és preservada la integritat de les membranes.
3. La incubació dels espermatozoides en β CD 8 mM, induïx la sortida de gairebé un 50% de colesterol de les seves membranes, segons una cinètica exponencial decreixent que arriba al nivell asimptòtic al cap d'uns 30 minuts. L'esmentat procés no afecta significativament la vitalitat de les cèl·lules.
4. La incubació dels espermatozoides en β CD 8 mM dóna lloc a un percentatge significatiu de reacció acrosòmica que s'inicia a la primera hora i finalitza cap a les 4 hores d'incubació. La sortida de colesterol, per si sola, induïx doncs, la reacció acrosòmica.
5. L'addició d'heparina al medi d'incubació amb β CD no dóna lloc a cap efecte sinèrgic ni sobre la sortida de colesterol ni sobre la RA. Això indica que l'eliminació de les *coating proteins* no és un requeriment

- necessari perquè la β CD pugui captar el colesterol de les membranes dels espermatozoides.
6. L'addició de progesterona a espermatozoides incubats durant 5 minuts amb β CD 8 mM augmenta significativament el percentatge de RA. La progesterona indueix RA únicament quan el colesterol ha estat eliminat de les membranes dels espermatozoides.
 7. Les dades experimentals obtingudes per anisotropia de fluorescència en liposomes i en cèl·lules senceres s'han ajustat a sigmoïdes unimodals i bimodals respectivament, mètode que ens ha permès determinar acuradament els paràmetres del comportament termotròpic. En el cas d'espermatozoides sencers, s'han distingit dues transicions de fase diferents, atribuïbles a diferents dominis lipídics. A les membranes dels espermatozoides coexisteixen regions fluïdes amb regions clarament més rígides.
 8. La sortida de colesterol dóna lloc a importants canvis en l'extensió relativa de les dues transicions de fase, indicant un increment de la fluïdesa d'alguns microdominis lipídics de la membrana dels espermatozoides i una reorganització lateral dels dominis lipídics, just abans de l'inici de la RA.
 9. S'han determinat, per microscòpia confocal, mitjançant la MC 540 com a marcador de fluïdesa, quatre patrons de marcatge diferents en la membrana de l'espermatozoide boc. Els tres patrons majoritaris es diferencien pel seu marcatge en el cap: o bé el marcatge es presenta en tot l'acrosoma, o bé és limitat al segment equatorial o bé es troba en el

segment equatorial i en el segment apical a la vegada. El patró minoritari es caracteritza per tenir el postacrosoma més marcat.

10. La sortida de colesterol fa variar la freqüència d'aquests quatre patrons de marcatge per MC 540. Així augmenta la freqüència del patró que presenta un marcatge limitat al segment equatorial i del patró el marcatge del qual és en el segment equatorial i en el segment apical. La sortida de colesterol fa augmentar la fluïdesa de la membrana plasmàtica dels espermatozoides de boc en uns macrodiminis ben definits, el segment equatorial, el segment apical i la peça intermèdia. La fluïdesa de la regió postacrosomal roman inalterada.
11. La citometria de flux ha permès atribuir al conjunt de la població d'espermatozoides vius un augment de fluïdesa de membrana induïda per la incubació de β CD 8 mM durant 1h. Aquesta fluïdesa es veu incrementada encara, al cap de dues hores, coincidint amb la RA massiva.

7 BIBLIOGRAFIA

Bibliografia

- Abou-Haila, A. and Tulsiani, D. R. (2000). "Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function." Arch Biochem Biophys **379**(2): 173-82.
- Aguas, A. P. and Pinto da Silva, P. (1983). "Regionalization of transmembrane glycoproteins in the plasma membrane of boar sperm head is revealed by fracture-label." J Cell Biol **97**(5 Pt 1): 1356-64.
- Ahuja, K. K. (1985). "Carbohydrate determinants involved in mammalian fertilization." Am J Anat **174**(3): 207-23.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. D. and Watson, J. D. (1994). Molecular Biology of the Cell. New York and London, Garland Publishing.
- Allain, C. C., Poon, L. S., Chan, C. S., Richmond, W. and Fu, P. C. (1974). "Enzymatic determination of total serum cholesterol." Clin Chem **20**(4): 470-5.
- Amato, M. E., Djedaini, F., Pappalardo, G. C., Perly, B. and Scarlata, G. (1992). "Molecular modeling of beta-cyclodextrin complexes with nootropic drugs." J Pharm Sci **81**(12): 1157-61.
- Antunes-Madeira, M. C., Videira, R. A. and Madeira, V. M. (1994). "Effects of parathion on membrane organization and its implications for the mechanisms of toxicity." Biochim Biophys Acta **1190**(1): 149-54.
- Arnoult, C., Kazam, I. G., Visconti, P. E., Kopf, G. S., Villaz, M. and Florman, H. M. (1999). "Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(12): 6757-62.
- Aveldano, M. I., Rotstein, N. P. and Vermouth, N. T. (1992). "Lipid remodelling during epididymal maturation of rat spermatozoa. Enrichment in plasmenylcholines containing long-chain polyenoic fatty acids of the n-9 series." Biochem J **283** (Pt 1): 235-41.
- Baldi, E., Luconi, M., Bonaccorsi, L. and Forti, G. (1998). "Nongenomic effects of progesterone on spermatozoa: mechanisms of signal transduction and clinical implications." Front Biosci **3**: D1051-9.
- Baldi, E., Luconi, M., Bonaccorsi, L., Muratori, M. and Forti, G. (2000). "Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity and acrosome reaction." Front Biosci **5**: E110-23.
- Barenholz, Y. and Thompson, T. E. (1999). "Sphingomyelin: biophysical aspects." Chem Phys Lipids **102**(1-2): 29-34.

Bibliografia

- Bartholow, L. C. and Geyer, R. P. (1981). "Sterol release in mammalian cells. The role of a liposomal-free albumin-phospholipid complex." Biochim Biophys Acta **665**(1): 40-7.
- Bartlett, G. R. (1959). "Phosphorus assay in column chromatography." J Biol Chem **234**(3): 466-8.
- Bearer, E. L. and Friend, D. S. (1981). "Maintenance of lipid domains in the guinea pig sperm membrane." J Cell Biol **91** (2, Pt. 2): 266a (Abstract).
- Bearer, E. L. and Friend, D. S. (1982). "Modifications of anionic-lipid domains preceding membrane fusion in guinea pig sperm." J Cell Biol **92**(3): 604-15.
- Bearer, E. L. and Friend, D. S. (1990). "Morphology of mammalian sperm membranes during differentiation, maturation, and capacitation." J Electron Microsc Tech **16**(4): 281-97.
- Bedford, J. M., Mock, O. B. and Phillips, D. M. (1997). "Unusual ampullary sperm crypts, and behavior and role of the cumulus oophorus, in the oviduct of the least shrew, *Cryptotis parva*." Biol Reprod **56**(5): 1255-67.
- Benoff, S. (1993). "Preliminaries to fertilization. The role of cholesterol during capacitation of human spermatozoa." Hum Reprod **8**(12): 2001-6.
- Benoff, S., Cooper, G. W., Hurley, I., Mandel, F. S. and Rosenfeld, D. L. (1993a). "Antisperm antibody binding to human sperm inhibits capacitation induced changes in the levels of plasma membrane sterols." Am J Reprod Immunol **30**(2-3): 113-30.
- Benoff, S., Cooper, G. W., Hurley, I., Napolitano, B., Rosenfeld, D. L., Scholl, G. M. and Hershlag, A. (1993b). "Human sperm fertilizing potential in vitro is correlated with differential expression of a head-specific mannose-ligand receptor." Fertil Steril **59**(4): 854-62.
- Benoff, S., Hurley, I., Cooper, G. W., Mandel, F. S., Hershlag, A., Scholl, G. M. and Rosenfeld, D. L. (1993c). "Fertilization potential in vitro is correlated with head-specific mannose-ligand receptor expression, acrosome status and membrane cholesterol content." Hum Reprod **8**(12): 2155-66.
- Benoff, S., Hurley, I., Cooper, G. W., Mandel, F. S., Rosenfeld, D. L. and Hershlag, A. (1993d). "Head-specific mannose-ligand receptor expression in human spermatozoa is dependent on capacitation-associated membrane cholesterol loss." Hum Reprod **8**(12): 2141-54.

- Bernik, D. L. and Disalvo, E. A. (1993). "Gel state surface properties of phosphatidylcholine liposomes as measured with merocyanine 540." Biochim Biophys Acta **1146**(2): 169-77.
- Berruti, G. and Franchi, E. (1986). "Calcium and polyphosphoinositides: their distribution in relation to the membrane changes occurring in the head of boar spermatozoa." Eur J Cell Biol **41**(2): 238-45.
- Bhattacharya, S. and Haldar, S. (2000). "Interactions between cholesterol and lipids in bilayer membranes. Role of lipid headgroup and hydrocarbon chain-backbone linkage." Biochim. Biophys. Acta **1467**(1): 39-53.
- Biltonen, R. L. and Freire, E. (1978). "Thermodynamic characterization of conformational states of biological macromolecules using differential scanning calorimetry." CRC Crit Rev Biochem **5**(2): 85-124.
- Bligh, E. G. and Dyer, W. J. (1959). "A rapid method of total lipid extraction and purification." Can. J. Biochem. Physiol. **37**: 911-917.
- Blume, A. (1980). "Thermotropic behavior of phosphatidylethanolamine-cholesterol and phosphatidylethanolamine-phosphatidylcholine-cholesterol mixtures." Biochemistry **19**(21): 4908-13.
- Boatman, D. E. and Robbins, R. S. (1991). "Bicarbonate: carbon-dioxide regulation of sperm capacitation, hyperactivated motility, and acrosome reactions." Biol Reprod **44**(5): 806-13.
- Bradley, M. P., Rayns, D. G. and Forrester, I. T. (1980). "Effects of filipin, digitonin, and polymyxin b on plasma membrane of ram spermatozoa--an EM study." Arch Androl **4**(3): 195-204.
- Breitbart, H. (2002a). "Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction." Mol Cell Endocrinol **187**(1-2): 139-44.
- Breitbart, H. (2002b). "Role and regulation of intracellular calcium in acrosomal exocytosis." J Reprod Immunol **53**(1-2): 151-9.
- Bronson, R. A., Peresleni, T. and Golightly, M. (1999). "Progesterone promotes the acrosome reaction in capacitated human spermatozoa as judged by flow cytometry and CD46 staining." Mol Hum Reprod **5**(6): 507-12.
- Brown, D. A. and London, E. (1998). "Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes." J. Membr. Biol. **164**(2): 103-14.
- Brown, R. E. (1998). "Sphingolipid organization in biomembranes: what physical studies of model membranes reveal." J Cell Sci **111** (Pt 1): 1-9.

- Brucker, C. and Lipford, G. B. (1995). "The human sperm acrosome reaction: physiology and regulatory mechanisms. An update." Hum Reprod Update **1**(1): 51-62.
- Brzustowicz, M. R., Cherezov, V., Caffrey, M., Stillwell, W. and Wassall, S. R. (2002). "Molecular organization of cholesterol in polyunsaturated membranes: microdomain formation." Biophys. J. **82**(1 Pt 1): 285-98.
- Calvete, J. J., Solis, D., Sanz, L., Diaz-Maurino, T., Schafer, W., Mann, K. and Topfer-Petersen, E. (1993). "Characterization of two glycosylated boar spermadhesins." Eur J Biochem **218**(2): 719-25.
- Calvo, L., Vantman, D., Banks, S. M., Tezon, J., Koukoulis, G. N., Dennison, L. and Sherins, R. J. (1989). "Follicular fluid-induced acrosome reaction distinguishes a subgroup of men with unexplained infertility not identified by semen analysis." Fertil Steril **52**(6): 1048-54.
- Cameron, D. G., Martin, A. and Mantsch, H. H. (1983). "Membrane isolation alters the gel to liquid crystal transition of *Achoeloplasma laidlawii* B." Science **219**: 180-182.
- Cao, X., Ben, K. and Wang, Y. (1997). "Effects of gamma-aminobutyric acid, progesterone and ionophore A23187 on acrosome reaction of tree shrew sperm in vitro: examination of acrosome reaction with an improved fluorescence microscopy." Anim Reprod Sci **49**(2-3): 225-34.
- Carlini, E., Palmerini, C. A., Cosmi, E. V. and Arienti, G. (1997). "Fusion of sperm with prostasomes: effects on membrane fluidity." Arch Biochem Biophys **343**(1): 6-12.
- Chandonnet, L., Roberts, K. D., Chapdelaine, A. and Manjunath, P. (1990). "Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma." Mol Reprod Dev **26**(4): 313-8.
- Chauhan, M. S., Singla, S. K., Manik, R. S. and Madan, M. L. (1997). "Increased capacitation of buffalo sperm by heparin as confirmed by electron microscopy and in vitro fertilization." Indian J Exp Biol **35**(10): 1038-43.
- Cheetham, J. J., Chen, R. J. and Epan, R. M. (1990). "Interaction of calcium and cholesterol sulphate induces membrane destabilization and fusion: implications for the acrosome reaction." Biochim Biophys Acta **1024**(2): 367-72.
- Chen, J. Y., Cheung, N. H., Fung, M. C., Wen, J. M., Leung, W. N. and Mak, N. K. (2000). "Subcellular localization of merocyanine 540 (MC540) and induction of apoptosis in murine myeloid leukemia cells." Photochem Photobiol **72**(1): 114-20.

Bibliografia

- Chen, S. C., Sturtevant, J. M. and Gaffney, B. J. (1980). "Scanning calorimetric evidence for a third phase transition in phosphatidylcholine bilayers." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(9): 5060-3.
- Cheng, F. P., Gadella, B. M., Voorhout, W. F., Fazeli, A., Bevers, M. M. and Colenbrander, B. (1998). "Progesterone-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa is mediated by a plasma membrane progesterone receptor." Biol Reprod **59**(4): 733-42.
- Christova, Y., James, P. S., Cooper, T. G. and Jones, R. (2002). "Lipid diffusion in the plasma membrane of mouse spermatozoa: changes during epididymal maturation, effects of pH, osmotic pressure, and knockout of the c-ros gene." J Androl **23**(3): 384-92.
- Cordoba, M., Santa-Coloma, T. A., Beorlegui, N. B. and Beconi, M. T. (1997). "Intracellular calcium variation in heparin-capacitated bovine sperm." Biochem Mol Biol Int **41**(4): 725-33.
- Cowan, A. E. and Myles, D. G. (1993). "Biogenesis of surface domains during spermiogenesis in the guinea pig." Dev Biol **155**(1): 124-33.
- Cowan, A. E., Myles, D. G. and Koppel, D. E. (1991). "Migration of the guinea pig sperm membrane protein PH-20 from one localized surface domain to another does not occur by a simple diffusion-trapping mechanism." Dev Biol **144**(1): 189-98.
- Cross, N. L. (1996a). "Effect of cholesterol and other sterols on human sperm acrosomal responsiveness." Mol. Reprod. Dev. **45**(2): 212-7.
- Cross, N. L. (1996b). "Human seminal plasma prevents sperm from becoming acrosomally responsive to the agonist, progesterone: cholesterol is the major inhibitor." Biol. Reprod. **54**(1): 138-45.
- Cross, N. L. (2000). "Sphingomyelin modulates capacitation of human sperm in vitro." Biol. Reprod. **63**(4): 1129-34.
- Cross, N. L. (2003). "Decrease in order of human sperm lipids during capacitation." Biol Reprod **69**(2): 529-34.
- Cross, N. L., Morales, P., Overstreet, J. W. and Hanson, F. W. (1988). "Induction of acrosome reactions by the human zona pellucida." Biol Reprod **38**(1): 235-44.
- Cross, N. L. and Overstreet, J. W. (1987). "Glycoconjugates of the human sperm surface: distribution and alterations that accompany capacitation in vitro." Gamete Res **16**(1): 23-35.
- Crowe, J. H., Hoekstra, F. A., Crowe, L. M., Anchordoguy, T. J. and Drobnis, E. (1989). "Lipid phase transitions measured in intact cells with Fourier transform infrared spectroscopy." Cryobiology **26**(1): 76-84.

- Crozet, N. (1994). "[Acrosome reaction and fertilization]." Contracept Fertil Sex **22**(5): 328-30.
- Davidson, W. S., Rodriguez, W. V., Lund-Katz, S., Johnson, W. J., Rothblat, G. H. and Phillips, M. C. (1995). "Effects of acceptor particle size on the efflux of cellular free cholesterol." J Biol Chem **270**(29): 17106-113.
- Davis, B. K. (1981). "Timing of fertilization in mammals: sperm cholesterol/phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(12): 7560-4.
- Davis, B. K. (1982). "Uterine fluid proteins bind sperm cholesterol during capacitation in the rabbit." Experientia **38**(9): 1063-4.
- Davis, B. K., Byrne, R. and Bedigian, K. (1980). "Studies on the mechanism of capacitation: albumin-mediated changes in plasma membrane lipids during in vitro incubation of rat sperm cells." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(3): 1546-50.
- Davis, B. K., Byrne, R. and Hungund, B. (1979). "Studies on the mechanism of capacitation. II. Evidence for lipid transfer between plasma membrane of rat sperm and serum albumin during capacitation in vitro." Biochim Biophys Acta **558**(3): 257-66.
- Desnoyers, L. and Manjunath, P. (1992). "Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid." J Biol Chem **267**(14): 10149-55.
- Dixit, N. S. and Mackay, R. A. (1983). "Absorption and emission characteristics of Merocyanine 540 in microemulsions." J. Am. Chem. Soc. **105**: 2928-2929.
- Dostalova, Z., Calvete, J. J., Sanz, L. and Topfer-Petersen, E. (1995a). "Boar spermadhesin AWN-1. Oligosaccharide and zona pellucida binding characteristics." Eur J Biochem **230**(1): 329-36.
- Dostalova, Z., Calvete, J. J. and Topfer-Petersen, E. (1995b). "Interaction of non-aggregated boar AWN-1 and AQN-3 with phospholipid matrices. A model for coating of spermadhesins to the sperm surface." Biol Chem Hoppe Seyler **376**(4): 237-42.
- Dragsten, P. R. and Webb, W. W. (1978). "Mechanism of the membrane potential sensitivity of the fluorescent membrane probe merocyanine 540." Biochemistry **17**(24): 5228-40.
- Drobnis, E. Z., Crowe, L. M., Berger, T., Anchordoguy, T. J., Overstreet, J. W. and Crowe, J. H. (1993). "Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model." J. Exp. Zool. **265**(4): 432-7.

- Ehrenwald, E., Foote, R. H. and Parks, J. E. (1990). "Bovine oviductal fluid components and their potential role in sperm cholesterol efflux." Mol Reprod Dev **25**(2): 195-204.
- Ehrenwald, E., Parks, J. E. and Foote, R. H. (1988a). "Cholesterol efflux from bovine sperm. I. Induction of the acrosome reaction with lysophosphatidylcholine after reducing sperm cholesterol." Gamete Res. **20**(2): 145-57.
- Ehrenwald, E., Parks, J. E. and Foote, R. H. (1988b). "Cholesterol efflux from bovine sperm: II. Effect of reducing sperm cholesterol on penetration of zona-free hamster and in vitro matured bovine ova." Gamete Res **20**(4): 413-20.
- Fabbri, R., Porcu, E., Lenzi, A., Gandini, L., Marsella, T. and Flamigni, C. (1998). "Follicular fluid and human granulosa cell cultures: influence on sperm kinetic parameters, hyperactivation, and acrosome reaction." Fertil Steril **69**(1): 112-7.
- Feuchter, F. A., Vernon, R. B. and Eddy, E. M. (1981). "Analysis of the sperm surface with monoclonal antibodies: topographically restricted antigens appearing in the epididymis." Biol Reprod **24**(5): 1099-110.
- First, N. L. and Parrish, J. J. (1987). "In-vitro fertilization of ruminants." J Reprod Fertil Suppl **34**: 151-65.
- Flaherty, S. P. and Olson, G. E. (1988). "Membrane domains in guinea pig sperm and their role in the membrane fusion events of the acrosome reaction." Anat Rec **220**(3): 267-80.
- Fléchon, J. E. (1985). "Sperm surface changes during the acrosome reaction as observed by freeze-fracture." Am J Anat **174**(3): 239-48.
- Flesch, F. M., Brouwers, J. F., Nievelstein, P. F., Verkleij, A. J., van Golde, L. M., Colenbrander, B. and Gadella, B. M. (2001). "Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane." J Cell Sci **114**(Pt 19): 3543-55.
- Flesch, F. M., Colenbrander, B., van Golde, L. M. and Gadella, B. M. (1999). "Capacitation induces tyrosine phosphorylation of proteins in the boar sperm plasma membrane." Biochem Biophys Res Commun **262**(3): 787-92.
- Flesch, F. M. and Gadella, B. M. (2000). "Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization." Biochim Biophys Acta **1469**(3): 197-235.

Bibliografia

- Florman, H. M. (1994). "Sequential focal and global elevations of sperm intracellular Ca²⁺ are initiated by the zona pellucida during acrosomal exocytosis." Dev Biol **165**(1): 152-64.
- Foresta, C., Rossato, M., Mioni, R. and Zorzi, M. (1992). "Progesterone induces capacitation in human spermatozoa." Andrologia **24**(1): 33-5.
- Fournier-Delpech, S. and Thibault, C. (1991). Acquisition de la fécondance du spermatozoïde, in La reproduction chez les mammifères et l'homme. C. Thibault and M. Levasseur, Inra Ellipses.
- Frenette, G., Lessard, C. and Sullivan, R. (2002). "Selected proteins of "prostasome-like particles" from epididymal cauda fluid are transferred to epididymal caput spermatozoa in bull." Biol Reprod **67**(1): 308-13.
- Friend, D. S. (1982). "Plasma-membrane diversity in a highly polarized cell." J Cell Biol **93**(2): 243-9.
- Friend, D. S. (1984). "Membrane organization and differentiation in the guinea pig spermatozoon." In: Ultrastructure of Reproduction. J. Van Blerkom and P.M.Motta, eds. Martinus Nijhoff, Boston.: 75-85.
- Frijlink, H. W., Eissens, A. C., Hefting, N. R., Poelstra, K., Lerk, C. F. and Meijer, D. K. (1991). "The effect of parenterally administered cyclodextrins on cholesterol levels in the rat." Pharm Res **8**(1): 9-16.
- Gadella, B. M., Flesch, F. M., van Golde, L. M. and Colenbrander, B. (1999). "Dynamics in the membrane organization of the mammalian sperm cell and functionality in fertilization." Vet Q **21**(4): 142-6.
- Gadella, B. M., Gadella, T. W., Jr., Colenbrander, B., van Golde, L. M. and Lopes-Cardozo, M. (1994). "Visualization and quantification of glycolipid polarity dynamics in the plasma membrane of the mammalian spermatozoon." J Cell Sci **107** (Pt 8): 2151-63.
- Gadella, B. M. and Harrison, R. A. (2000). "The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane." Development **127**(11): 2407-20.
- Gadella, B. M., Lopes-Cardozo, M., van Golde, L. M., Colenbrander, B. and Gadella, T. W., Jr. (1995). "Glycolipid migration from the apical to the equatorial subdomains of the sperm head plasma membrane precedes the acrosome reaction. Evidence for a primary capacitation event in boar spermatozoa." J Cell Sci **108** (Pt 3): 935-46.
- Gadella, B. M., Rath, R., Brouwers, J. F., Stout, T. A. and Colenbrander, B. (2001). "Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm." Anim Reprod Sci **68**(3-4): 249-65.

Bibliografía

- Garde, J. and Roldan, E. R. (2000). "Stimulation of Ca(2+)-dependent exocytosis of the sperm acrosome by cAMP acting downstream of phospholipase A2." J Reprod Fertil **118**(1): 57-68.
- Gennis, R. B. (1989). Biomembranes. Molecular Structure and Function. New York, Springer-Verlag, New York Inc.
- Gilbert, S. F. (2000). Developmental Biology. Sunderland (MA), BIOS Scientific Publishers, Ltd.
- Go, K. J. and Wolf, D. P. (1985). "Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation." Biol Reprod **32**(1): 145-53.
- Grancelli, A., Morros, A., Cabañas, M. E., Domènech, O., Merino, S., Vázquez, J. L. and Montero, T. (2002). "Interaction of 6-fluoroquinolones with dipalmitoylphosphatidylcholine monolayers and liposomes." Langmuir **18**: 3-6.
- Green, C. E. and Watson, P. F. (2001). "Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation." Reproduction **122**(6): 889-98.
- Hall, J. C., Hadley, J. and Doman, T. (1991). "Correlation between changes in rat sperm membrane lipids, protein, and the membrane physical state during epididymal maturation." J. Androl. **12**(1): 76-87.
- Hansen, C., Srikanthakumar, A. and Downey, B. R. (1991). "Presence of follicular fluid in the porcine oviduct and its contribution to the acrosome reaction." Mol Reprod Dev **30**(2): 148-53.
- Hao, M., Mukherjee, S. and Maxfield, F. R. (2001). "Cholesterol depletion induces large scale domain segregation in living cell membranes." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**(23): 13072-7.
- Harrison, R. A. (1996). "Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals." Reprod Fertil Dev **8**(4): 581-94.
- Harrison, R. A., Ashworth, P. J. and Miller, N. G. (1996). "Bicarbonate/CO₂, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes." Mol Reprod Dev **45**(3): 378-91.
- Harrison, R. A. and Miller, N. G. (2000). "cAMP-dependent protein kinase control of plasma membrane lipid architecture in boar sperm." Mol Reprod Dev **55**(2): 220-8.
- Harrison, R. A. P. and Gadella, B. M. (1995). Membrane changes during capacitation with special reference to lipid architecture. Human sperm acrosome reaction. Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd. **236**: 45-46.

Bibliografia

- Henkel, R., Franken, D. R. and Habenicht, U. F. (1998a). "Zona pellucida as physiological trigger for the induction of acrosome reaction." Andrologia **30**(4-5): 275-80.
- Henkel, R., Muller, C. and Miska, W. (1998b). "Induction of acrosome reaction by low temperature is comparable to physiological induction by human follicular fluid." Andrologia **30**(3): 159-61.
- Heyn, M. P., Blume, A., Rehorek, M. and Dencher, N. A. (1981). "Calorimetric and fluorescence depolarization studies on the lipid phase transition of bacteriorhodopsin--dimyristoylphosphatidylcholine vesicles." Biochemistry **20**(25): 7109-15.
- Hilderson, H. J. (1988). Subcellular Biochemistry. New York, Olenum Press.
- Holt, W. V. (1984). "Membrane heterogeneity in the mammalian spermatozoon." Int. Rev. Cytol. **87**: 159-94.
- Holt, W. V. and North, R. D. (1986). "Thermotropic phase transitions in the plasma membrane of ram spermatozoa." J. Reprod. Fertil. **78**(2): 447-57.
- Hoshi, K., Aita, T., Yanagida, K., Yoshimatsu, N. and Sato, A. (1990). "Variation in the cholesterol/phospholipid ratio in human spermatozoa and its relationship with capacitation." Hum Reprod **5**(1): 71-4.
- Houslay, M. D. and Stanley, K. K. (1990). Dyanmics of Biological Membranes. Essex, John Wiley & Sons Ltd.
- Humphries, G. M. and Lovejoy, J. P. (1983). "Cholesterol-free phospholipid domains may be the membrane feature selected by N epsilon-dansyl-L-lysine and merocyanine 540." Biochem Biophys Res Commun **111**(2): 768-774.
- Huneau, D., Crozet, N. and Ahmed-Ali, M. (1994). "Estrous sheep serum as a potent agent for ovine IVF: effect on cholesterol efflux from spermatozoa and the acrosome reaction." Theriogenology **42**: 1017-1028.
- Iijima, K., Shimoyama, N., Shimoyama, M., Mizuguchi, T. and Tamura, K. (1993). "Do low-power lasers change phase transition temperature of dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) membrane?" J Clin Laser Med Surg **11**(4): 191-5.
- Irie, T., Fukunaga, K. and Pitha, J. (1992). "Hydroxypropylcyclodextrins in parenteral use. I: Lipid dissolution and effects on lipid transfers in vitro." J Pharm Sci **81**(6): 521-3.

Bibliografia

- Jagannathan, S., Publicover, S. J. and Barratt, C. L. (2002). "Voltage-operated calcium channels in male germ cells." Reproduction **123**(2): 203-15.
- James, P. S., Wolfe, C. A., Ladha, S. and Jones, R. (1999). "Lipid diffusion in the plasma membrane of ram and boar spermatozoa during maturation in the epididymis measured by fluorescence recovery after photobleaching." Mol Reprod Dev **52**(2): 207-15.
- Janin, J. (1985). Méthodes Biophysiques pour l'étude des macromolécules. Paris, Hermann.
- John, K., Schreiber, S., Kubelt, J., Herrmann, A. and Muller, P. (2002). "Transbilayer movement of phospholipids at the main phase transition of lipid membranes: implications for rapid flip-flop in biological membranes." Biophys J **83**(6): 3315-23.
- Johnson, M. H. and Everitt, B. J. (2000). Essential Reproduction. Oxford, Blackwell Science Ltd.
- Johnson, W. J., Mahlberg, F. H., Rothblat, G. H. and Phillips, M. C. (1991). "Cholesterol transport between cells and high-density lipoproteins." Biochim Biophys Acta **1085**(3): 273-98.
- Kaiser, R. D. and London, E. (1998). "Location of diphenylhexatriene (DPH) and its derivatives within membranes: comparison of different fluorescence quenching analyses of membrane depth." Biochemistry **37**(22): 8180-90.
- Kaneko, T., Iida, H., Bedford, J. M. and Mori, T. (2001). "Spermatozoa of the shrew, *Suncus murinus*, undergo the acrosome reaction and then selectively kill cells in penetrating the cumulus oophorus." Biol Reprod **65**(2): 544-53.
- Kavak, A., Johannisson, A., Lundeheim, N., Rodriguez-Martinez, H., Aidnik, M. and Einarsson, S. (2003). "Evaluation of cryopreserved stallion semen from Tori and Estonian breeds using CASA and flow cytometry." Anim Reprod Sci **76**(3-4): 205-16.
- Kawakami, E., Vandervoort, C. A., Mahi-Brown, C. A. and Overstreet, J. W. (1993). "Induction of acrosome reactions of canine sperm by homologous zona pellucida." Biol Reprod **48**(4): 841-5.
- Kay, V. J., Coutts, J. R. and Robertson, L. (1994). "Effects of pentoxifylline and progesterone on human sperm capacitation and acrosome reaction." Hum Reprod **9**(12): 2318-23.
- Kilsdonk, E. P., Yancey, P. G., Stoudt, G. W., Bangerter, F. W., Johnson, W. J., Phillips, M. C. and Rothblat, G. H. (1995). "Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins." J Biol Chem **270**(29): 17250-6.

Bibliografia

- Kojro, E., Gimpl, G., Lammich, S., Marz, W. and Fahrenholz, F. (2001). "Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(10): 5815-20.
- Kumar, A., Gudi, S. R., Gokhale, S. M., Bhakuni, V. and Gupta, C. M. (1990). "Heat-induced alterations in monkey erythrocyte membrane phospholipid organization and skeletal protein structure and interactions." Biochim Biophys Acta **1030**(2): 269-78.
- Ladha, S. (1998). "Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the mammalian spermatozoon." J. Membr. Biol. **165**(1): 1-10.
- Lakowicz, J. R. (1983). Principles of Fluorescence Spectroscopy. New York, Plenum Press.
- Lakowicz, J. R. (1999). Principles of Fluorescence Spectroscopy. New York, Kluwer Academic / Plenum Publishers.
- Langlais, J., Kan, F. W., Granger, L., Raymond, L., Bleau, G. and Roberts, K. D. (1988). "Identification of sterol acceptors that stimulate cholesterol efflux from human spermatozoa during in vitro capacitation." Gamete Res **20**(2): 185-201.
- Langlais, J. and Roberts, K. D. (1985). "A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa." Gamete Res. **12**: 1883-224.
- Langner, M. and Hui, S. W. (1993). "Merocyanine interaction with phosphatidylcholine bilayers." Biochim Biophys Acta **1149**(1): 175-9.
- Langner, M. and Hui, S. W. (1999). "Merocyanine 540 as a fluorescence indicator for molecular packing stress at the onset of lamellar-hexagonal transition of phosphatidylethanolamine bilayers." Biochim Biophys Acta **1415**(2): 323-30.
- Lentz, B. R. (1993). "Use of fluorescent probes to monitor molecular order and motions within liposome bilayers." Chem Phys Lipids **64**(1-3): 99-116.
- Lentz, B. R., Freire, E. and Biltonen, R. L. (1978). "Fluorescence and calorimetric studies of phase transitions in phosphatidylcholine multilayers: kinetics of the pretransition." Biochemistry **17**(21): 4475-80.
- Lewis, R. N. A. H. and McElhaney, R. N. (1992). The mesomorphic phase behavior of lipids bilayers, in The structure of biological membranes. P. Yeagle. Boca Ratón, Florida, USA, CRC Press: 73-155.

Bibliografía

- Lin, Y. and Kan, F. W. (1996). "Regionalization and redistribution of membrane phospholipids and cholesterol in mouse spermatozoa during in vitro capacitation." Biol. Reprod. **55**(5): 1133-46.
- Llanos, M. N. and Anabalon, M. C. (1996). "Studies related to progesterone-induced hamster sperm acrosome reaction." Mol Reprod Dev **45**(3): 313-9.
- Llanos, M. N., Morales, P. and Riffo, M. S. (1993). "Studies of lysophospholipids related to the hamster sperm acrosome reaction in vitro." J Exp Zool **267**(2): 209-16.
- Lui, C. W., Cornett, L. E. and Meizel, S. (1977). "Identification of the bovine follicular fluid protein involved in the in vitro induction of the hamster sperm acrosome reaction." Biol Reprod **17**(1): 34-41.
- Mabrey, S. and Sturtevant, J. M. (1976). "Investigation of phase transitions of lipids and lipid mixtures by sensitivity differential scanning calorimetry." Proc Natl Acad Sci U S A **73**(11): 3862-6.
- Mabrey, S. and Sturtevant, J. M. (1977). "Incorporation of saturated fatty acids into phosphatidylcholine bilayers." Biochim Biophys Acta **486**(3): 444-50.
- Mantsch, H. H., Martin, A. and Cameron, D. G. (1981). "Characterization by infrared spectroscopy of the bilayer to nonbilayer phase transition of phosphatidylethanolamines." Biochemistry **20**(11): 3138-45.
- Martínez, P. and Morros, A. (1996). "Membrane lipid dynamics during human sperm capacitation." Front. Biosci. **1**: d103-17.
- McMullen, T. P., Lewis, R. N. and McElhaney, R. N. (1993). "Differential scanning calorimetric study of the effect of cholesterol on the thermotropic phase behavior of a homologous series of linear saturated phosphatidylcholines." Biochemistry **32**(2): 516-22.
- Meizel, S. (1985). "Molecules that initiate or help stimulate the acrosome reaction by their interaction with the mammalian sperm surface." Am J Anat **174**(3): 285-302.
- Meizel, S., Turner, K. O. and Nuccitelli, R. (1997). "Progesterone triggers a wave of increased free calcium during the human sperm acrosome reaction." Dev Biol **182**(1): 67-75.
- Melendrez, C. S., Meizel, S. and 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**(4): 433-8.
- Meyers, S. A., Overstreet, J. W., Liu, I. K. and Drobnis, E. Z. (1995). "Capacitation in vitro of stallion spermatozoa: comparison of

- progesterone-induced acrosome reactions in fertile and subfertile males." J Androl **16**(1): 47-54.
- Miller, D. J., Winer, M. A. and Ax, R. L. (1990). "Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin." Biol Reprod **42**(5-6): 899-915.
- Mishra, S., Somanath, P. R., Huang, Z. and Vijayaraghavan, S. (2003). "Binding and Inactivation of the Germ Cell-Specific Protein Phosphatase PP1 γ 2 by Sds22 During Epididymal Sperm Maturation." Biol Reprod.
- Moore, A., White, T. W., Ensrud, K. M. and Hamilton, D. W. (1989). "The major maturation glycoprotein found on rat cauda epididymal sperm surface is linked to the membrane via phosphatidylinositol." Biochem Biophys Res Commun **160**(2): 460-8.
- Morros, A., Iborra, A., Alsina, M. and Martinez, P. (1995). "Fluidity changes in sperm membranes during capacitation." In: Fénichel P, Parinaud J, eds. Proceedings of the Coloque INSERM. John Libbey Eurotext Ltd. **236**: 387 (Abstract).
- Mortimer, D. and Camenzind, A. R. (1989). "The role of follicular fluid in inducing the acrosome reaction of human spermatozoa incubated in vitro." Hum Reprod **4**(2): 169-74.
- Myles, D. G. and Primakoff, P. (1984). "Localized surface antigens of guinea pig sperm migrate to new regions prior to fertilization." J Cell Biol **99**(5): 1634-41.
- Nagae, T., Yanagimachi, R., Srivastava, P. N. and Yanagimachi, H. (1986). "Acrosome reaction in human spermatozoa." Fertil Steril **45**(5): 701-7.
- Navaneetham, D., Sivashanmugam, P. and Rajalakshmi, M. (1996). "Changes in binding of lectins to epididymal, ejaculated, and capacitated spermatozoa of the rhesus monkey." Anat Rec **245**(3): 500-8.
- Nemecz, G., Fontaine, R. N. and Schroeder, F. (1988). "A fluorescence and radiolabel study of sterol exchange between membranes." Biochim Biophys Acta **943**(3): 511-21.
- Nikolajczyk, B. S. and O'Rand, M. G. (1992). "Characterization of rabbit testis beta-galactosidase and arylsulfatase A: purification and localization in spermatozoa during the acrosome reaction." Biol Reprod **46**(3): 366-78.
- Nikolopoulou, M., Soucek, D. A. and Vary, J. C. (1985). "Changes in the lipid content of boar sperm plasma membranes during epididymal maturation." Biochim Biophys Acta **815**(3): 486-98.

Bibliografia

- Nimmo, M. R. and Cross, N. L. (2003). "Structural features of sterols required to inhibit human sperm capacitation." Biol Reprod **68**(4): 1308-17.
- Nolan, J. P. and Hammerstedt, R. H. (1997). "Regulation of membrane stability and the acrosome reaction in mammalian sperm." Faseb J **11**(8): 670-82.
- Ohtani, Y., Irie, T., Uekama, K., Fukunaga, K. and Pitha, J. (1989). "Differential effects of α -, β -, and γ -cyclodextrins on human erythrocytes." Eur. J. Biochem. **186**: 17-22.
- Ohvo-Rekila, H., Ramstedt, B., Leppimaki, P. and Slotte, J. P. (2002). "Cholesterol interactions with phospholipids in membranes." Prog. Lipid Res. **41**(1): 66-97.
- Oliphant, G., Reynolds, A. B. and Thomas, T. S. (1985). "Sperm surface components involved in the control of the acrosome reaction." Am J Anat **174**(3): 269-83.
- Olson, G. E., Nagdas, S. K. and Winfrey, V. P. (1997). "Temporal expression and localization of protein farnesyltransferase during spermiogenesis and posttesticular sperm maturation in the hamster." Mol Reprod Dev **48**(1): 71-6.
- Olson, G. E., Winfrey, V. P. and NagDas, S. K. (1998). "Acrosome biogenesis in the hamster: ultrastructurally distinct matrix regions are assembled from a common precursor polypeptide." Biol Reprod **58**(2): 361-70.
- O'Rand, M. G. and Fisher, S. J. (1987). "Localization of zona pellucida binding sites on rabbit spermatozoa and induction of the acrosome reaction by solubilized zonae." Dev Biol **119**(2): 551-9.
- Orgebin-Crist, M. C. and Jahad, N. (1979). "The maturation of rabbit epididymal spermatozoa in organ culture: stimulation by epididymal cytoplasmic extracts." Biol Reprod **21**(2): 511-5.
- Osheroff, J. E., Visconti, P. E., Valenzuela, J. P., Travis, A. J., Alvarez, J. and Kopf, G. S. (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. **5**(11): 1017-26.
- Oshio, S., Kaneko, S. and Mohri, H. (1986). "Impurities in commercial preparations of bovine serum albumin inhibit the acrosome reaction of hamster spermatozoa." Zool. Sci. **3**(2): 295-299.

Bibliografia

- Osman, R. A., Andria, M. L., Jones, A. D. and Meizel, S. (1989). "Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction." Biochem Biophys Res Commun **160**(2): 828-33.
- Parinaud, J., Labal, B. and Vieitez, G. (1992). "High progesterone concentrations induce acrosome reaction with a low cytotoxic effect." Fertil Steril **58**(3): 599-602.
- Parks, J. E., Arion, J. W. and Foote, R. H. (1987). "Lipids of plasma membrane and outer acrosomal membrane from bovine spermatozoa." Biol Reprod **37**(5): 1249-58.
- Parks, J. E. and Hammerstedt, R. H. (1985). "Development changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane." Biol Reprod **32**(3): 653-68.
- Parks, J. E., Lee, D. R., Huang, S. and Kaproth, M. T. (2003). "Prospects for spermatogenesis in vitro." Theriogenology **59**(1): 73-86.
- Parrish, J. J., Susko-Parrish, J., Winer, M. A. and First, N. L. (1988). "Capacitation of bovine sperm by heparin." Biol Reprod **38**(5): 1171-80.
- Parrish, J. J., Susko-Parrish, J. L., Handrow, R. R., Sims, M. M. and First, N. L. (1989). "Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid." Biol Reprod **40**(5): 1020-5.
- Pena, F. J., Johannisson, A., Wallgren, M. and Rodriguez-Martinez, H. (2004). "Effect of hyaluronan supplementation on boar sperm motility and membrane lipid architecture status after cryopreservation." Theriogenology **61**(1): 63-70.
- Pereira, R. J., Tuli, R. K., Wallenhorst, S. and Holtz, W. (2000). "The effect of heparin, caffeine and calcium ionophore A23187 on in vitro induction of the acrosome reaction in frozen-thawed bovine and caprine spermatozoa." Theriogenology **54**(2): 185-92.
- Peterson, R. N., Gillott, M., Hunt, W. and Russell, L. D. (1987). "Organization of the boar spermatozoan plasma membrane: evidence for separate domains (subdomains) of integral membrane proteins in the plasma membrane overlying the principal segment of the acrosome." J Cell Sci **88** (Pt 3): 343-9.
- Peterson, R. N. and Russell, L. D. (1985). "The mammalian spermatozoon: a model for the study of regional specificity in plasma membrane organization and function." Tissue Cell **17**(6): 769-91.
- Petrunkina, A. M., Lakamp, A., Gentzel, M., Ekhlasi-Hundrieser, M. and Topfer-Petersen, E. (2003). "Fate of lactadherin P47 during post-

- testicular maturation and capacitation of boar spermatozoa." Reproduction **125**(3): 377-87.
- Phillips, M. C., Johnson, W. J. and Rothblat, G. H. (1987). "Mechanisms and consequences of cellular cholesterol exchange and transfer." Biochim Biophys Acta **906**(2): 223-76.
- Pilikian, S., Guerin, J. F., Adeleine, P., Ecochard, R. and Czyba, J. C. (1992). "Spontaneous and ionophore induced acrosome reaction in asthenozoospermic infertile semen." Hum Reprod **7**(7): 991-3.
- Pitha, J., Irie, T., Sklar, P. B. and Nye, J. S. (1988). "Drug solubilizers to aid pharmacologists: amorphous cyclodextrin derivatives." Life Sci **43**(6): 493-502.
- Poulos, A., Brown-Woodman, P. D., White, I. G. and Cox, R. I. (1975). "Changes in phospholipids of ram spermatozoa during migration through the epididymis and possible origin of prostaglandin F₂alpha in testicular and epididymal fluid." Biochim Biophys Acta **388**(1): 12-8.
- Poulos, A., Voglmayr, J. K. and White, I. G. (1973). "Phospholipid changes in spermatozoa during passage through the genital tract of the bull." Biochim Biophys Acta **306**(2): 194-202.
- Prattes, S., Horl, G., Hammer, A., Blaschitz, A., Graier, W. F., Sattler, W., Zechner, R. and Steyrer, E. (2000). "Intracellular distribution and mobilization of unesterified cholesterol in adipocytes: triglyceride droplets are surrounded by cholesterol-rich ER-like surface layer structures." J Cell Sci **113** (Pt 17): 2977-89.
- Ramsey, B. L. and Westphal, U. (1978). "Steroid-protein interactions. 40. The effect of fatty acids on progesterone binding to human serum albumin." Biochim Biophys Acta **529**(1): 115-22.
- Ramstedt, B. and Slotte, J. P. (2002). "Membrane properties of sphingomyelins." FEBS Lett **531**(1): 33-7.
- Rana, A. P., Majumder, G. C., Misra, S. and Ghosh, A. (1991). "Lipid changes of goat sperm plasma membrane during epididymal maturation." Biochim. Biophys. Acta **1061**(2): 185-96.
- Rathi, R., Colenbrander, B., Bevers, M. M. and Gadella, B. M. (2001). "Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa." Biol Reprod **65**(2): 462-70.
- Rathi, R., Colenbrander, B., Stout, T. A., Bevers, M. M. and Gadella, B. M. (2003). "Progesterone induces acrosome reaction in stallion spermatozoa via a protein tyrosine kinase dependent pathway." Mol Reprod Dev **64**(1): 120-8.

Bibliografía

- Rathi, R. L. ú. d. l. M. c. a. s. p. a. d. c. e. e. d. d. l. h. e. b. e. A. s. s. h. u. a. (2001). "Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa." Biol. Reprod. **65**(2): 462-70.
- Ravnik, S. E., Albers, J. J. and Muller, C. H. (1993). "A novel view of albumin-supported sperm capacitation: role of lipid transfer protein-I." Fertil Steril **59**(3): 629-38.
- Ravnik, S. E., Zarutskie, P. W. and Muller, C. H. (1990). "Lipid transfer activity in human follicular fluid: relation to human sperm capacitation." J Androl **11**(3): 216-26.
- Richardson, R. T., Nikolajczyk, B. S., Abdullah, L. H., Beavers, J. C. and O'Rand, M. G. (1991). "Localization of rabbit sperm acrosin during the acrosome reaction induced by immobilized zona matrix." Biol Reprod **45**(1): 20-6.
- Rietveld, A. and Simons, K. (1998). "The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts." Biochim Biophys Acta **1376**(3): 467-79.
- Riffo, M., Gomez Lahoz, E. and Esponda, P. (1992). "Immunocytochemical localization of phospholipase A2 in hamster spermatozoa." Histochemistry **97**(1): 25-31.
- Riffo, M. and Nieto, A. (1999). "Lysophosphatidylcholine induces changes in physicochemical, morphological, and functional properties of mouse zona pellucida: a possible role of phospholipase A2 in sperm-zona pellucida interaction." Mol Reprod Dev **53**(1): 68-76.
- Riffo, M. S. and Parraga, M. (1996). "Study of the acrosome reaction and the fertilizing ability of hamster epididymal cauda spermatozoa treated with antibodies against phospholipase A2 and/or lysophosphatidylcholine." J Exp Zool **275**(6): 459-68.
- Riffo, M. S. and Parraga, M. (1997). "Role of phospholipase A2 in mammalian sperm-egg fusion: development of hamster oolemma fusibility by lysophosphatidylcholine." J Exp Zool **279**(1): 81-8.
- Rodrigueza, W. V., Williams, K. J., Rothblat, G. H. and Phillips, M. C. (1997). "Remodeling and shuttling. Mechanisms for the synergistic effects between different acceptor particles in the mobilization of cellular cholesterol." Arterioscler Thromb Vasc Biol **17**(2): 383-93.
- Roldan, E. R. and Mollinedo, F. (1991). "Diacylglycerol stimulates the Ca²⁺(+)-dependent phospholipase A2 of ram spermatozoa." Biochem Biophys Res Commun **176**(1): 294-300.

Bibliografia

- Rothblat, G. H. and Phillips, M. C. (1982). "Mechanism of cholesterol efflux from cells. Effects of acceptor structure and concentration." J Biol Chem **257**(9): 4775-82.
- Rufas, O., Gilman, A., Fisch, B. and Shalgi, R. (1998). "Spontaneous and follicular fluid-induced acrosome reaction in sperm samples from in vitro fertilizing and nonfertilizing normozoospermic patients." J Assist Reprod Genet **15**(2): 84-9.
- Ruvolo, G., Cassara, G., Di Bella, M. A., Parrinello, D., Manno, M., Cimino, C., Bajamonte, M., Cittadini, E. and De Leo, G. (1995). "Activation of the acrosome reaction after treatment with human follicular fluid. A morphofunctional evaluation useful for in vitro fertilization." Acta Eur Fertil **26**(4): 125-30.
- Saaranen, M. J., Calvo, L., Dennison, L., Banks, S., Bustillo, M., Dorfmann, A. D., Goldstein, M., Thorsell, L., Schulman, J. D. and Sherins, R. J. (1993). "Acrosome reaction inducing activity in follicular fluid correlates with progesterone concentration but not with oocyte maturity or fertilizability." Hum Reprod **8**(9): 1448-54.
- Sanz, L., Calvete, J. J., Mann, K., Gabius, H. J. and Topfer-Petersen, E. (1993). "Isolation and biochemical characterization of heparin-binding proteins from boar seminal plasma: a dual role for spermadhesins in fertilization." Mol Reprod Dev **35**(1): 37-43.
- Saragueta, P., Lanuza, G., Miranda, P. V., Tezon, J. G. and Baranao, J. L. (1994). "Immunoglobulins from human follicular fluid induce the acrosome reaction in human sperm." Mol Reprod Dev **39**(3): 280-8.
- Saxena, N., Peterson, R. N., Sharif, S., Saxena, N. K. and Russell, L. D. (1986). "Changes in the organization of surface antigens during in vitro capacitation of boar spermatozoa as detected by monoclonal antibodies." J Reprod Fertil **78**(2): 601-14.
- Schlegel, R. A., Hammerstedt, R., Cofer, G. P., Kozarsky, K., Freidus, D. and Williamson, P. (1986). "Changes in the organization of the lipid bilayer of the plasma membrane during spermatogenesis and epididymal maturation." Biol Reprod **34**(2): 379-91.
- Schroeder, F., Jefferson, J. R., Kier, A. B., Knittel, J., Scallen, T. J., Wood, W. G. and Hapala, I. (1991). "Membrane cholesterol dynamics: cholesterol domains and kinetic pools." Proc Soc Exp Biol Med **196**(3): 235-52.
- Senuma, M., Yamano, S., Nakagawa, K., Irahara, M., Kamada, M. and Aono, T. (2001). "Progesterone accelerates the onset of capacitation in mouse sperm via T-type calcium channels." Arch Androl **47**(2): 127-34.

- Shechter, E. (1990). Biochimie et biophysique des membranes. Paris, Masson S. A.
- Shinitzky, M. and Barenholz, Y. (1978). "Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization." Biochim. Biophys. Acta **515**(4): 367-94.
- Sieber, F. (1987). "Merocyanine 540." Photochem Photobiol **46**(6): 1035-42.
- Siegel, M. S., Paulson, R. J. and Graczykowski, J. W. (1990). "The influence of human follicular fluid on the acrosome reaction, fertilizing capacity and proteinase activity of human spermatozoa." Hum Reprod **5**(8): 975-80.
- Siiteri, J. E., Dandekar, P. and Meizel, S. (1988a). "Human sperm acrosome reaction-initiating activity associated with the human cumulus oophorus and mural granulosa cells." J Exp Zool **246**(1): 71-80.
- Siiteri, J. E., Gottlieb, W. and Meizel, S. (1988b). "Partial characterization of a fraction from human follicular fluid that initiates the human sperm acrosome reaction in vitro." Gamete Res **20**(1): 25-42.
- Simons, K. and Ikonen, E. (2000). "How cells handle cholesterol." Science **290**(5497): 1721-6.
- Sirivaidyapong, S., Bevers, M. M., Gadella, B. M. and Colenbrander, B. (2001). "Induction of the acrosome reaction in dog sperm cells is dependent on epididymal maturation: the generation of a functional progesterone receptor is involved." Mol Reprod Dev **58**(4): 451-9.
- Sivashanmugam, P. and Rajalakshmi, M. (1997). "Sperm maturation in rhesus monkey: changes in ultrastructure, chromatin condensation, and organization of lipid bilayer." Anat Rec **247**(1): 25-32.
- Slavik, J. (1994). Fluorescent Probes in Cellular and Molecular Biology. Boca Raton, CRC Press, Inc.
- Slotte, J. P. (1999). "Sphingomyelin-cholesterol interactions in biological and model membranes." Chem Phys Lipids **102**(1-2): 13-27.
- Somanath, P. R. and Gandhi, K. K. (2002). "Expression of membrane associated non-genomic progesterone receptor(s) in caprine spermatozoa." Anim Reprod Sci **74**(3-4): 195-205.
- Somanath, P. R., Suraj, K. and Gandhi, K. K. (2000). "Caprine sperm acrosome reaction: promotion by progesterone and homologous zona pellucida." Small Rumin.Res. **37**(3): 279-286.
- Srivastav, A. (2000). "Maturation-dependent glycoproteins containing both N- and O-linked oligosaccharides in epididymal sperm plasma membrane of rhesus monkeys (*Macaca mulatta*)." J Reprod Fertil **119**(2): 241-52.

Bibliografía

- Srivastava, A. and Olson, G. E. (1996). "Studies on [³H]palmitate-binding proteins of rat spermatozoa: a post-translational modification of membrane proteins by fatty acid acylation." J Reprod Fertil **108**(2): 245-51.
- Stewart, J. C. M. (1980). "Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate." Anal Biochem **104**: 10-14.
- Stillwell, W., Wassall, S. R., Dumaul, A. C., Ehringer, W. D., Browning, C. W. and Jencki, L. J. (1993). "Use of merocyanine (MC540) in quantifying lipid domains and packing in phospholipid vesicles and tumor cells." Biochim Biophys Acta **1146**(1): 136-44.
- Stryer, L. (1988). Bioquímica. Barcelona, editorial Reverté, s. a.
- Sugkraroek, P., Kates, M., Leader, A. and Tanphaichitr, N. (1991). "Levels of cholesterol and phospholipids in freshly ejaculated sperm and Percoll-gradient-pelleted sperm from fertile and unexplained infertile men." Fertil. Steril. **55**(4): 820-7.
- Suzuki, F. and Yanagimachi, R. (1989). "Changes in the distribution of intramembranous particles and filipin-reactive membrane sterols during in vitro capacitation of golden hamster spermatozoa." Gamete Res **23**(3): 335-47.
- Szasz, F., Cheng, F. P., Marks, A., Colenbrander, B. and Solti, L. (1997). "Induction of acrosome reaction in dog sperm by calcium ionophore." Acta Vet Hung **45**(2): 177-87.
- Talbot, P. and Chacon, R. S. (1981). "A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm." J Exp Zool **215**(2): 201-8.
- Tarlatzis, B. C., Dangelis, J., Kolibianakis, E. M., Papadimas, J., Bontis, J., Lagos, S. and Mantalenakis, S. (1993). "Effect of follicular fluid on the kinetics of human sperm acrosome reaction in vitro." Arch Androl **31**(3): 167-75.
- Tesarik, J. (1985). "Comparison of acrosome reaction-inducing activities of human cumulus oophorus, follicular fluid and ionophore A23187 in human sperm populations of proven fertilizing ability in vitro." J Reprod Fertil **74**(2): 383-8.
- Tesarik, J., Carreras, A. and Mendoza, C. (1993). "Differential sensitivity of progesterone- and zona pellucida-induced acrosome reactions to pertussis toxin." Mol Reprod Dev **34**(2): 183-9.
- Therien, I. and Manjunath, P. (2003). "Effect of progesterone on bovine sperm capacitation and acrosome reaction." Biol Reprod **69**(4): 1408-15.

Bibliografia

- Therien, I., Moreau, R. and Manjunath, P. (1998). "Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm." Biol Reprod **59**(4): 768-76.
- Thomas, P. and Meizel, S. (1988). "An influx of extracellular calcium is required for initiation of the human sperm acrosome reaction induced by human follicular fluid." Gamete Res **20**(4): 397-411.
- Tilcock, C. P. and Fisher, D. (1979). "Interaction of phospholipid membranes with poly(ethylene glycol)s." Biochim Biophys Acta **557**(1): 53-61.
- Topfer-Petersen, E., Romero, A., Varela, P. F., Ekhlasi-Hundrieser, M., Dostalova, Z., Sanz, L. and Calvete, J. J. (1998). "Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives." Andrologia **30**(4-5): 217-24.
- Toshimori, K., Higashi, R. and Oura, C. (1985). "Distribution of intramembranous particles and filipin-sterol complexes in mouse sperm membranes: polyene antibiotic filipin treatment." Am J Anat **174**(4): 455-70.
- Toyama, Y. and Nagano, T. (1988). "Maturation changes of the plasma membrane of rat spermatozoa observed by surface replica, rapid-freeze and deep-etch, and freeze-fracture methods." Anat Rec **220**(1): 43-50.
- Tsvetkova, N. M., Walker, N. J., Crowe, J. H., Field, C. L., Shi, Y. and Tablin, F. (2000). "Lipid phase separation correlates with activation in platelets during chilling." Mol. Membr. Biol. **17**(4): 209-18.
- Tulsiani, D. R., NagDas, S. K., Skudlarek, M. D. and Orgebin-Crist, M. C. (1995). "Rat sperm plasma membrane mannosidase: localization and evidence for proteolytic processing during epididymal maturation." Dev Biol **167**(2): 584-95.
- Ucar, O. and Parkinson, T. J. (2003). "In vitro induction of the acrosome reaction in ovine spermatozoa by calcium ionophore A23187." Acta Vet Hung **51**(1): 103-9.
- Ursini, F., Heim, S., Kiess, M., Maiorino, M., Roveri, A., Wissing, J. and Flohe, L. (1999). "Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation." Science **285**(5432): 1393-6.
- Valencia, A., Wens, M. A., Merchant, H., Reyes, R. and Delgado, N. M. (1984). "Capacitation of human spermatozoa by heparin." Arch Androl **12 Suppl**: 109-13.
- van der Meer, B. W. (1993). Fluidity, dynamics and order, in Biomembranes: Physical aspects. M. Shinitzky. Weinheim, Germany, VCH: 98-158.

- Varner, D. D., Bowen, J. A. and Johnson, L. (1993). "Effect of heparin on capacitation/acrosome reaction of equine sperm." Arch Androl **31**(3): 199-207.
- Verkman, A. S. and Frosch, M. P. (1985). "Temperature-jump studies of merocyanine 540 relaxation kinetics in lipid bilayer membranes." Biochemistry **24**(25): 7117-22.
- Vernon, R. B., Hamilton, M. S. and Eddy, E. M. (1985). "Effects of in vivo and in vitro fertilization environments on the expression of a surface antigen of the mouse sperm tail." Biol Reprod **32**(3): 669-80.
- Vernon, R. B., Muller, C. H. and Eddy, E. M. (1987). "Further characterization of a secreted epididymal glycoprotein in mice that binds to sperm tails." J Androl **8**(3): 123-8.
- Visconti, P. E., Galantino-Homer, H., Ning, X., Moore, G. D., Valenzuela, J. P., Jorgez, C. J., Alvarez, J. G. and Kopf, G. S. (1999). "Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: beta-cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation." J. Biol. Chem. **274**(5): 3235-42.
- Visconti, P. E., Westbrook, V. A., Chertihin, O., Demarco, I., Sleight, S. and Diekman, A. B. (2002). "Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity." J Reprod Immunol **53**(1-2): 133-50.
- Vorup-Jensen, T., Hjort, T., Abraham-Peskir, J. V., Guttman, P., Jensenius, J. C., Uggerhoj, E. and Medenwaldt, R. (1999). "X-ray microscopy of human spermatozoa shows change of mitochondrial morphology after capacitation." Hum Reprod **14**(4): 880-4.
- Vos, J. P., Lopes-Cardozo, M. and Gadella, B. M. (1994). "Metabolic and functional aspects of sulfogalactolipids." Biochim. Biophys. Acta **1211**(2): 125-49.
- Williamson, P., Mattocks, K. and Schlegel, R. A. (1983). "Merocyanine 540, a fluorescent probe sensitive to lipid packing." Biochim Biophys Acta **732**(2): 387-93.
- Wolf, C., Koumanov, K., Tenchov, B. and Quinn, P. J. (2001). "Cholesterol favors phase separation of sphingomyelin." Biophys. Chem. **89**(2-3): 163-72.
- Wolf, D. E. (1987a). "Diffusion and the control of membrane regionalization." Ann. N.Y. Acad. Sci. **513**: 247-61.
- Wolf, D. E. (1987b). "Overcoming random diffusion in polarized cells--corralling the drunken beggar." Bioessays **6**(3): 116-21.

- Wolf, D. E. (1995). "Lipid domains in sperm plasma membranes." Mol. Membr. Biol. **12**(1): 101-4.
- Wolf, D. E., Hagopian, S. S. and Ishijima, S. (1986a). "Changes in sperm plasma membrane lipid diffusibility after hyperactivation during in vitro capacitation in the mouse." J. Cell. Biol. **102**(4): 1372-7.
- Wolf, D. E., Hagopian, S. S., Lewis, R. G., Voglmayr, J. K. and Fairbanks, G. (1986b). "Lateral regionalization and diffusion of a maturation-dependent antigen in the ram sperm plasma membrane." J. Cell. Biol. **102**(5): 1826-31.
- Wolf, D. E., Lipscomb, A. C. and Maynard, V. M. (1988). "Causes of nondiffusing lipid in the plasma membrane of mammalian spermatozoa." Biochemistry **27**(3): 860-5.
- Wolf, D. E., Maynard, V. M., McKinnon, C. A. and Melchior, D. L. (1990). "Lipid domains in the ram sperm plasma membrane demonstrated by differential scanning calorimetry." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**(17): 6893-6.
- Wolf, D. E., Scott, B. K. and Millette, C. F. (1986c). "The development of regionalized lipid diffusibility in the germ cell plasma membrane during spermatogenesis in the mouse." J Cell Biol **103**(5): 1745-50.
- Wolf, D. E. and Voglmayr, J. K. (1984). "Diffusion and regionalization in membranes of maturing ram spermatozoa." J Cell Biol **98**(5): 1678-84.
- Wolfe, C. A., James, P. S., Gunning, A. P., Ladha, S., Christova, Y. and Jones, R. (2001). "Lipid dynamics in the plasma membrane of ram and bull spermatozoa after washing and exposure to macromolecules BSA and PVP." Mol Reprod Dev **59**(3): 306-13.
- Wolfe, C. A., James, P. S., Mackie, A. R., Ladha, S. and Jones, R. (1998). "Regionalized lipid diffusion in the plasma membrane of mammalian spermatozoa." Biol Reprod **59**(6): 1506-14.
- Wolkers, W. F., Crowe, L. M., Tsvetkova, N. M., Tablin, F. and Crowe, J. H. (2002). "In situ assessment of erythrocyte membrane properties during cold storage." Mol. Membr. Biol. **19**(1): 59-65.
- Yanagimachi, R. (1994). Mammalian fertilization, in Physiology of Reproduction. E. Knobil and J. D. Neil. New York, Raven Press: 189-317.
- Yeagle, P. L. (1985). "Cholesterol and the cell membrane." Biochim Biophys Acta **822**(3-4): 267-87.
- Yeagle, P. L. (1991). "Modulation of membrane function by cholesterol." Biochimie **73**(10): 1303-10.

Bibliografia

- Yudin, A. I., Gottlieb, W. and Meizel, S. (1988). "Ultrastructural studies of the early events of the human sperm acrosome reaction as initiated by human follicular fluid." Gamete Res **20**(1): 11-24.
- Zarintash, R. J. and Cross, N. L. (1996). "Unesterified cholesterol content of human sperm regulates the response of the acrosome to the agonist, progesterone." Biol. Reprod. **55**(1): 19-24.
- Zeron, Y., Tomczak, M., Crowe, J. and Arav, A. (2002). "The effect of liposomes on thermotropic membrane phase transitions of bovine spermatozoa and oocytes: implications for reducing chilling sensitivity." Cryobiology **45**(2): 143-52.

8 ANNEX

8.1 Tampons i medis d'incubació

8.1.1 Composició dels medis

	M-199 Hanks' Solution	M-199 Earle's Salts
	(1x)	without phenol red (2x)
<u>Component</u>	<u>mg/L</u>	<u>mg/L</u>
sals inorgàniques		
Ca Cl ₂ .2H ₂ O	185.00	528.00
Fe(NO ₃) ₃ .9H ₂ O	0.72	1.40
KCl	60.00	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	200.00	400.00
NaCl	8000.00	13600.00
NaH ₂ PO ₄	48.00	-
NaH ₂ PO ₄ . 2H ₂ O	-	316.00
NaHCO ₃	350.00	2500.00
altres components		
2-Desoxi-D-ribosa	0.50	1.00
Acetat de sodi.3H ₂ O	83.00	166.0
Adenosina-5-fosfat	0.20	0.40
Adenosina-5-trifosfat	1.00	2.00
Colesterol	0.20	0.40
D-Glucosa	1000.00	2000.00
Glutació (reduït)	0.05	0.10
Guanina	0.30	0.60
Hipoxantina	0.30	0.60
Ribosa	0.50	1.00
Sulfat d'adenina	10.00	20.00
Timina	0.30	0.60
Tween 80	20.00	40.00

Annex

Uracil	0.30	0.60
Vermell de fenol	20.00	-
Xantina	0.30	0.60

Aminoàcids

DL-Àcid aspàrtic	60.00	120.00
DL-Àcid glutàmic	150.00	267.32
DL-Alanina	50.00	100.00
DL-Fenilalanina	50.00	100.00
DL-Isoleucina	120.00	240.00
DL-Metionina	30.00	60.00
DL-Serina	50.00	100.00
DL-Treonina	60.00	120.00
DL-Valina	50.00	100.00
Glicina	50.00	100.00
L-Arginina.HCl	70.00	140.00
L-cisteïna HCl	0.10	0.22
L-Cisteïna	20.00	40.00
L-Glutamina	100.00	200.00
L-Hidroxiprolina	10.00	20.00
L-Histidina HCl.H ₂ O	21.80	43.76
L-Isoleucina	40.00	80.00
L-Lisina.HCl	70.00	140.00
L-Prolina	40.00	80.00
L-Tirosina	40.00	80.00
L-Triptòfan	10.00	20.00

Vitamines

Àcid ascòrbic	0.05	0.10
Àcid fòlic	0.01	0.02
Àcid nicotínic	0.025	0.05
Àcid para-aminobenzoïc	0.05	0.10
Calciferol	0.10	0.20
Colina clorhidre	0.50	1.00
d-Biotin	0.01	0.02
D-Pantotenat de calci	0.01	0.02
i-Inositol	0.05	0.10

Annex

Menadiona	0.01	0.02
Nicotinamida	0.025	0.05
Piridoxal HCl	0.025	0.05
Piridoxina HCl	0.025	0.05
Riboflavina	0.01	0.02
Tiamina HCl	0.01	0.02
Vitamina A (acetat)	0.10	0.20

8.1.2 Composició del tampó TBS

Tris HCl 10 mM + NaCl 150 mM a pH 7.4.