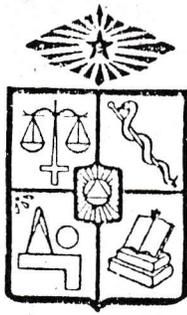


UCH-FC  
LIC-B  
R572



DEPARTAMENTO BIOLOGIA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

# REFECUNDACION IN VITRO DE HUEVOS DE HAMSTER CON ESPERMIOS HETEROLOGOS

Tesis de grado para  
optar al título de  
Licenciado en Ciencias  
con mención en Biología

ALIDA RIHM JACOB



Profesor guía  
Dr. CLAUDIO BARROS

Profesor patrocinante  
Dr. LUIS IZQUIERDO

Santiago. Julio de 1979

*a mis padres*

*a Günter*

*a Robert y Andreas*

Deseo expresar mis más sinceros agradecimientos a mi profesor guía, Dr. Claudio Barros, quien no ha escatimado esfuerzos para impulsar y orientar el desarrollo de este trabajo, además de haberme impartido constantemente una enseñanza valiosísima en mi formación profesional.

Además quiero agradecer a todos los miembros del Laboratorio de Embriología de la Pontificia Universidad Católica de Chile por su colaboración siempre oportuna y desinteresada, en especial a la Sra. Elena Herrera, la Srta. Consuelo Alcalde, la Sra. Hedy Herrera y al Sr. Pedro Cortéz.

Hago extensibles mis agradecimientos a los Drs. Luis Izquierdo y Víctor Monasterio por las facilidades otorgadas para la utilización del microscopio electrónico y a todos aquellos que de alguna forma me brindaron su apoyo durante la realización de este trabajo.

Este trabajo fue financiado en parte por:

Proyecto Binacional, Programa PNUD/UNESCO, RLA 78/024

Proyecto de Investigación Nº 92/78 D.I.U.C.

Proyecto FLAMIRH 64.142.1.77-R

## RESUMEN

Mediante la técnica de refecundación in vitro se ha estudiado el comportamiento de la membrana plasmática de huevos fecundados de hamster frente a espermios heterólogos.

Los huevos de hamster se obtuvieron de hembras cruzadas o inseminadas artificialmente entre cinco y 18 horas post-inseminación. Estos huevos fueron tratados enzimáticamente para eliminar las células del cúmulo óforo y disolver la zona pelúcida y luego se inseminaron con espermios de cobayo o ratón previamente capacitados. Después de 1.5 horas de incubación los huevos se observaron con el microscopio de contraste de fases. La evidencia de refecundación fué la presencia de una o varias zonas de dispersión de cromatina del espermio heterólogo.

Se encontró que los huevos de hamster son refecundables con espermios de ratón hasta 8 horas post-inseminación y con espermios de cobayo son refecundables hasta 14 horas post-inseminación. En ambos casos el período de refecundación es significativamente menor que aquel encontrado por Usui y Yanagimachi (1976) para la refecundación homóloga. La refecundación se relacionó con el desarrollo del pronúcleo macho producto de la fecundación.

El estudio ultraestructural demostró que hay cambios a nivel de la membrana plasmática ovular como consecuencia de la fecundación. Estos cambios se evidencian antes para los espermios heterólogos que para los homólogos, e incluso para algunos espermios heterólogos antes que para otros. La dispersión de la cromatina espermática en cambio no es especie-específica y ocurre siempre cuando ha habido fusión de membranas gaméticas.

## I N D I C E

RESUMEN.....	i
INTRODUCCION.....	1
Cambios morfológicos y fisiológicos que ocurren durante la capacitación.....	7
Aglutinación.....	7
Activación.....	8
Reacción del Acrosoma.....	10
Paso del espermio por las cubiertas oocitarias.....	17
MATERIALES Y METODOS.....	22
Recuperación de huevos de hamster fecundados..	22
Preparación de los espermios.....	23
Refecundación <u>in vitro</u> .....	24
Preparación del material para microscopía electrónica.....	25
RESULTADOS.....	26
Evolución del pronúcleo del espermio fecundante.....	26
Refecundación con espermios de cobayo.....	27
Refecundación con espermios de ratón.....	28
Estudio ultraestructural.....	29

DISCUSION.....	34
Fusión gamética.....	34
Especificidad.....	34
Modalidad.....	40
Dispersión de la cromatina espermática.....	43
Influencia del citoplasma.....	43
Modalidad.....	47
CONCLUSIONES.....	50
REFERENCIAS.....	52
TABLAS.....	67
FIGURAS.....	69

## INTRODUCCION

En 1951 tanto Austin como Chang comunicaron independientemente que los espermatozoides eyaculados de mamíferos debían permanecer por algunas horas en el tracto genital de la hembra como un prerequisite para adquirir su capacidad fertilizante.

En sus experimentos Austin (1951), depositó quirúrgicamente espermatozoides poco tiempo después de la ovulación, en el saco periovárico de la rata. El observó que la fecundación comenzaba 4 horas después de la inseminación a pesar de encontrar espermatozoides alrededor de los huevos a 1 hora post-inseminación. Obtuvo resultados similares cuando en vez de usar la técnica de la inseminación artificial dejó que los animales se cruzaran espontáneamente después de la ovulación (Austin, 1952). Chang (1951) en cambio, inseminó artificialmente conejas antes y después de la ovulación, realizando autopsias 36 horas más tarde. El encontró que al realizar las inseminaciones 4 horas antes de la ovulación obtenía huevos fecundados. Sin embargo, cuando las inseminaciones las realizaba 2 horas antes o después de la ovulación, ningún huevo aparecía fecundado. El interpretó estos resultados como indicadores de la necesidad que tenían los

espermatozoides de permanecer un mínimo de horas en la vía genital de la hembra para adquirir su capacidad fecundante. Al inseminar las hembras después de la ovulación, los huevos se hacían impenetrables a los espermatozoides antes que estos adquirieran su capacidad fértil. Chang (1955) confirmó estos hallazgos al obtener altos porcentajes de fecundación en hembras inseminadas después de la ovulación, pero con espermatozoides previamente incubados por 12 horas en el útero de otra hembra en estro.

Austin (1952) llamó a este fenómeno "capacitación espermática", sin pronunciarse sobre sus características y sólo suponiendo que durante la permanencia de los espermatozoides en la vía genital ellos debían sufrir cambios fisiológicos que los "capacitaran" para fecundar. Este hecho se ilustra mejor con la siguiente cita: "It is uncertain what capacitation involves, but it seems to take place in at least 2 hrs. in the rat and 4 hrs. in the rabbit" (Austin y Bishop, 1957, p.84). La necesidad de capacitación ha sido establecida experimentalmente en otras especies de mamíferos, tales como hamster dorado (Strauss, 1956; Chang y Sheaffer, 1957), gato (Hamner, Jennings y Sojka, 1970), oveja (Mattner, 1963) y cerdo (Hunter y Dziuk, 1968), etc.

Los primeros estudios realizados en conejo, orientados a estudiar las condiciones ambientales en que ocurre la capa-

citación, establecieron que las secreciones del útero (Chang, 1955) y del oviducto (Adams y Chang, 1962) son esenciales para este fenómeno; más aún, se comprobó que ambas actúan sinérgicamente (Bedford, 1969). Esta actividad capacitadora parece estar bajo la influencia de las hormonas esteroidales. Los estrógenos, sin ser esenciales (Chang, 1958), la favorecen (Soupart, 1967), en cambio, la progesterona tiene un fuerte efecto inhibitorio sobre la actividad capacitadora del útero (Chang, 1958) pero no sobre la del oviducto (Bedford, 1972a).

Los componentes macromoleculares de las secreciones uterinas parecerían ser esenciales en la adquisición de la capacitación debido a que espermatozoides puestos en un filtro "Millipore" de tamaño de poro conocido e incubados en el útero de una hembra en estro no logran capacitarse (Williams, Weinman y Hamner, 1964). La identificación de estos componentes no ha sido posible aún en el conejo, sin embargo, como veremos más adelante se ha obtenido gran cantidad de información con estudios realizados in vitro en otras especies de mamíferos.

Yanagimachi y Chang (1964) fecundaron por primera vez oocitos de hamster in vitro mezclando espermios epididimarios con el líquido del oviducto que acompañaba a los oocitos. Más tarde, Barros y Austin (1967) fecundaron in vitro oocitos de hamster recuperados del ovario con espermios epididimarios

suspendidos en líquido folicular y del oviducto. Estos resultados indican que se podía prescindir de las secreciones de la vía genital de la hembra para obtener capacitación. Más aún, se ha podido capacitar espermios de hamster in vitro incubándolos en líquido folicular de la vaca (Yanagimachi, 1969a; Barros y Garavagno, 1970) del ratón y la rata (Yanagimachi, 1969a) y en fluido del oviducto de la rata (Barros, 1968) y del conejo (Iwamatsu y Chang, 1972). Barros y Garavagno (1970) y Yanagimachi (1970b) capacitaron espermios de hamster in vitro con suero sanguíneo homólogo y heterólogo.

Es probable que todos los fluidos utilizados para obtener capacitación tengan propiedades químicas comunes, y que el factor que induce la capacitación no sea sintetizado en el tracto genital de la hembra sino que sea transportado a este lugar por el torrente sanguíneo (Barros y Garavagno, 1970). Las macromoléculas del suero son aparentemente importantes en la capacitación y de ellas se ha comprobado que la fracción albúmina es en algunas especies la más necesaria (hamster: Yanagimachi, 1970b; Lui y Meizel, 1977; ratón: Miyamoto y Chang, 1973; humano: Barros, González, Herrera y Bustos-Obregón, 1978).

Estudios de capacitación in vitro en medios químicamente definidos han contribuido a una mejor comprensión de este complejo problema. Así, Bavister (1969) fecundó huevos de

hamster in vitro con espermios eyaculados manteniéndolos en solución Tyrode enriquecida con albúmina sérica y piruvato de sodio. Sin embargo, Bavister no tomó la precaución de asegurarse que en el medio no había líquido del oviducto como contaminante y éste bien podría haber sido el responsable de permitir la capacitación espermática.

Oocitos de ratón, cuyas células del cúmulo se eliminaron con hialuronidasa, no se fecundaron cuando se incubaron con espermios en medio Krebs-Ringer bicarbonato con glucosa (medio básico). Si este medio se enriquecía con 1mM de piruvato de sodio, se obtenía un 25% de fecundación. Porcentajes de fecundación más altos (60 - 86%) se obtuvieron cuando al medio de cultivo se le agregó albúmina sérica. Finalmente, al enriquecer el medio básico con albúmina sérica, piruvato de sodio y lactato de sodio se pudo acortar el tiempo de capacitación de 2 a 1 hora, sin disminución de la tasa de fecundación (Miyamoto y Chang, 1973). En la rata por otra parte, Toyoda y Chang (1974a y b) capacitaron espermios en un medio de cultivo que tenía albúmina sérica y un cociente Na/K más bajo que en los fluidos corporales. También se ha podido capacitar espermatozoides humanos en medios químicamente definidos con albúmina sérica (Yanagimachi, Yanagimachi y Rogers, 1976) en un período de más de 7 horas. Este tiempo pudo ser acortado a menos de una hora al aumentar el contenido de albú

mina sérica de 1 mg/ml a 35 mg/ml (Barros, González, Herrera y Bustos-Obregón, 1978 y 1979). En el cobayo se ha podido obtener espermios capacitados tanto en medios que contienen albúmina (Yanagimachi, 1972a y b) como en soluciones salinas sin macromoléculas (Barros, Berríos y Herrera, 1973). Resultados diferentes se han obtenido con espermios de toro y perro. Los primeros deben ser incubados en el oviducto de vaca aislado quirúrgicamente (Iritani y Niwa, 1977) y los segundos se tienen que incubar en presencia de huevos en cúmulo (Mahi y Yanagimachi, 1976) para obtener capacitación.

Es interesante destacar en este momento que hasta la fecha no ha sido posible capacitar espermatozoides de conejo in vitro ya sea en medios químicamente definidos o con fluidos corporales complejos (Bedford, 1970a y b). Parecería que el espermatozoide de conejo es más bien una excepción a la regla y que la capacitación espermática depende más del conjunto de condiciones físico-químicas que de un factor inductor específico de la capacitación (Bavister, 1969; Barros, 1974). Por otra parte resulta claro que la capacitación in vivo en la vía genital de la hembra esté relacionada con un ordenamiento cronológico de los cambios que deben experimentar los espermatozoides en relación al momento de la ovulación y fecundación. El tracto genital aseguraría la capacitación al momento apropiado para conseguir la más alta tasa de fecundación (Barros, 1974).

Cambios morfológicos y fisiológicos que ocurren durante la capacitación.

Hasta el presente no se ha podido identificar ningún fenómeno biológico que pueda considerarse inequívocamente como representativo de la capacitación espermática (ver Barros, Garavagno y Berríos, 1974). Sin embargo, se ha podido identificar cambios que sufre el espermio durante el tiempo que transcurre entre la eyaculación y la fecundación.

Los cambios mejor estudiados son:

a) aglutinación, b) activación, y c) reacción del acrosoma.

Aglutinación:

Se ha observado que los espermios de algunas especies de mamíferos por ejemplo hamster o cobayo se aglutinan cuando se incuban in vitro en fluidos corporales o soluciones fisiológicas sintéticas (Yanagimachi, 1969b; Barros, 1974). En el hamster esta aglutinación aparece y se mantiene durante las 2 primeras horas de incubación después de las cuales los espermios se liberan. Los espermios se unen por sus regiones acrosómicas o región acrosómica de uno con región post-acrosómica del otro. Los puntos de contacto pueden desplazarse debido al movimiento flagelar pero nunca hay unión entre 2 regiones post-acrosómicas (Yanagimachi, 1969b). La aglutinación no es de tipo inmunológico y es probable que la unión de

los espermios puede estar dada por cambios que ocurren en la superficie espermática durante la incubación. Sin embargo, Yanagimachi, Nicolson, Noda y Fujimoto (1973) usando técnicas de marcaje con hidróxido de fierro coloidal no encontraron diferencias en la distribución de cargas de superficie en espermios de hamster frescos o capacitados.

Se ignora si este fenómeno es una etapa importante o necesaria en la capacitación. Bedford (1970b) encontró que los espermios humanos y de primates sub-humanos no muestran la tendencia a la aglutinación. Dado que la capacitación de dichos espermios no sería diferente a la de otros mamíferos que sí se aglutinan, se podría pensar que dicho evento no es esencial en los cambios que debe sufrir el espermio para poder fecundar.

#### Activación:

Yanagimachi (1969b y 1970b) encontró que espermios de hamster al desaglutinarse después de 2 a 3 horas de permanencia en el medio de capacitación, exhiben un movimiento en que el flagelo bate con gran amplitud y alta frecuencia. Un fenómeno similar fué descrito por Barros, Berríos y Herrera (1973), al incubar espermios de cobayo en medio BMOC-2 (Brinster, 1971) sin macromoléculas. Recientemente Katz, Yanagimachi y Dresdner (1978) reestudiaron este fenómeno con microcinematografía de

alta velocidad en espermios de hamster y cobayo activados y no activados. Ellos encontraron que el batir de la cola del espermio no activado es de baja amplitud y alta frecuencia, mientras que el espermio activado tiene un movimiento flage-lar de gran amplitud pero de baja frecuencia. Luego calcularon la potencia hidrodinámica desarrollada por los espermios frescos e incubados encontrando valores que no son significativamente diferentes. En el espermio recién eyaculado la potencia está dada por un batir de alta frecuencia, lo cual le confiere movimiento de avance. Por el contrario el movimiento del espermio activado no es progresivo, es un movimiento amplio que abarca una gran superficie hacia los lados del espermio lo cual aumenta la probabilidad de contacto de éste con las envolturas del huevo. A su vez, este movimiento le da al espermio mayor fuerza de penetración. Esto concuerda con la posición de Bedford (1972a), quién postula que la activación probablemente le confiere al espermio la fuerza necesaria para penetrar a la zona pelúcida.

La activación debe ser un cambio importante que ocurre durante la capacitación porque se observa siempre al incubar espermios en medios que la permiten y no se observa en medios en los cuales no ocurre la capacitación. Sin embargo, la activación no es una manifestación directa de capacitación. De ser así, espermios activados con acrosoma intacto deberían ser

capaces de fecundar oocitos desprovistos de zona pelúcida. Barros y Berríos (1977) incubaron espermios de hamster en un medio de composición química definida sin macromoléculas, que permitía mantener temporalmente espermios activados sin que estos sufrieran la reacción del acrosoma. Estos espermios eran capaces de adherirse fuertemente a la membrana plasmática de huevos de hamster sin zona pero nunca, incluso después de incubaciones largas, se produjo fusión gamética.

Yanagimachi (1969b) encontró que en el líquido folicular de bovino hay una fracción que es dializable y termoes- table a los 90°C, la que tiene la propiedad de estimular la motilidad espermática. Mahi y Yanagimachi (1973) demostraron que la activación espermática es dependiente de la temperatura, así espermios de hamster incubados a 40°C se activan en 2,5 horas, en cambio a 23°C se activan en 12 horas.

Es posible que los cambios que se producen en la superficie espermática durante las primeras etapas de la incubación puedan modificar la disponibilidad de metabolitos exógenos y esto a su vez provocar la activación (Barros, 1974).

#### Reacción del acrosoma:

Austin y Bishop (1958 a,b,c) describieron cambios morfológicos que sufre la cabeza del espermio de mamíferos durante el paso por el tracto genital femenino o por las envolturas

del huevo. Ellos encontraron que el acrosoma del espermio de varias especies de roedores se hincha y luego se desprende, fenómeno que se denominó reacción del acrosoma. Esta reacción se ha podido estudiar en experimentos realizados in vitro observándose que ella ocurre inmediatamente después de la activación espermática. Desde un punto de vista ultraestructural se ha observado que esta reacción se produce por múltiples rupturas de la membrana plasmática y acrosómica externa, las que posteriormente se fusionan entre sí dejando una estructura fenestrada. Este proceso lleva a la formación de vesículas cuya membrana está formada por membrana plasmática y acrosómica externa. Entre vesícula y vesícula se establece una comunicación entre el interior del acrosoma y el medio extracelular lo que permitiría la difusión de enzimas acrosómicas (Barros, Bedford, Franklin y Austin, 1967 y Franklin, Barros y Fussel, 1970). La reacción ocurre en todo el acrosoma excepto en la región del segmento ecuatorial, la que permanece, por un tiempo al menos, sin reaccionar. En el extremo más anterior de este segmento se fusionan los bordes de la membrana plasmática y acrosómica externa asegurándose así la continuidad de membrana en el espermio. Como consecuencia de la reacción del acrosoma queda expuesta la membrana acrosómica interna en la parte anterior del espermio.

Yanagimachi (1969b) aisló una fracción macromolecular del líquido folicular de bovino, la que no dializa y es termo-

lábil a 90°C. Esta fracción tenía la propiedad de inducir la reacción del acrosoma de espermios de hamster. En el suero sanguíneo se ha encontrado también un componente macromolecular cuya presencia es necesaria para la reacción del acrosoma y que parece ser la albúmina o alguna molécula asociada con ella (Yanagimachi, 1970b). Lui y Meizel (1977) confirmaron que la albúmina es importante en la inducción de la reacción del acrosoma. Sin embargo, vieron que al hidrolizar la albúmina con pepsina no se perdía el poder inductor de la reacción del acrosoma. Este hecho llevó a Lui y Meizel (1977) a concluir que la reacción del acrosoma depende más bien de una molécula asociada a la albúmina misma.

La necesidad del ión Ca en la reacción del acrosoma de espermios de mamíferos fué demostrada al incubar espermios de cobayo en medio MCM (Barros, 1974) en el que se obtiene normalmente porcentajes de reacción cercanos al 100 %. Cuando se usaba ese mismo medio pero libre de  $Ca^{++}$  se obtenía casi un 100 % de inhibición (Barros, 1974).

Por otra parte, Yanagimachi y Usui (1974) confirmaron que la reacción del acrosoma es calcio-dependiente al incubar espermios de cobayo en un medio sin  $Ca^{++}$  en el cual obtuvieron activación pero no reacción. Sin embargo, inmediatamente después de agregar  $Ca^{++}$  la mayor parte de los espermios

sufrían la reacción del acrosoma. En experimentos controlados, en que los espermios no habían sido preincubados, la adición de  $\text{Ca}^{++}$  no inducía la reacción. Los autores sugieren que durante la incubación ocurrirían cambios a nivel de la membrana plasmática del espermio, como el desenmascaramiento o activación de sitios que ligan o transportan  $\text{Ca}^{++}$ .

Dada la importancia del  $\text{Ca}^{++}$  se puede esperar que cualquier agente que favorezca el flujo de este ión hacia el interior de la célula, favorecería la reacción acrosómica. Así Talbot, Summers, Hylander, Keough y Franklin (1976) estudiaron el efecto del ionóforo de  $\text{Ca}^{++}$  A 23187, sobre espermios de equinodermos y mamíferos. Los espermios de equinodermos sufrieron la reacción acrosómica inmediatamente después de ser colocados en el medio que contenía el ionóforo. En espermios de cobayo y de hamster el ionóforo reduce el tiempo de incubación previo a la reacción pero no se puede prescindir de ella. El efecto del ionóforo sobre la reacción del acrosoma es más claro por los resultados obtenidos con espermios de hamster que con los de cobayo y equinodermos, debido a que los espermios de cobayo pueden reaccionar en 10 minutos manteniéndolos entre porta y cubreobjetos en un medio de composición química definida (Barros, Berríos y Herrera, 1973) y los espermios de equinodermos reaccionan inmediatamente en presencia de gelatina ovular o pH extracelular



alto (Collins y Epel, 1977).

La necesidad del flujo de  $\text{Ca}^{++}$  en la reacción se ha investigado estudiando las modificaciones del acrosoma en presencia de hiamina. Este detergente, a una concentración de 0,003 %, induce la reacción en espermios de cobayo en 10 a 15 minutos. El efecto inductor de la hiamina se podía inhibir reversiblemente usando medios de cultivo carentes de  $\text{Ca}^{++}$  (Yanagimachi, 1975). Wooding (1975) obtuvo resultados similares trabajando con espermios de toro. Es probable que los detergentes actúen modificando componentes de la superficie o componentes estructurales de la membrana. Esto aumentaría la permeabilidad al  $\text{Ca}^{++}$ , lo que a su vez provocaría la reacción del acrosoma.

Finalmente se vió que agentes como  $\text{Mg}^{++}$  o pH bajo, que disminuyen el flujo de  $\text{Ca}^{++}$ , bloquean la reacción, igual que la ausencia de  $\text{Ca}^{++}$  (Collins, Epel, 1977).

El nivel celular y el mecanismo preciso de acción del  $\text{Ca}^{++}$  en la reacción del acrosoma se desconoce. Yanagimachi y Usui (1974) plantean que el  $\text{Ca}^{++}$  tal vez neutralice cargas negativas existentes en la cara interna de la membrana plasmática y externa de la membrana acrosómica externa. Así, al neutralizarse las cargas, sería posible un acercamiento y posterior fusión de las membranas. Según Yanagimachi y Usui (1974) otro mecanismo probable sería que el  $\text{Ca}^{++}$  provoque en-

trada de agua al acrosoma. Al hincharse éste, quedaría su membrana exterior muy cerca de la membrana plasmática produciéndose la fusión entre ambas. En los dos casos el mecanismo planteado no sería suficiente porque no basta con que dos membranas estén muy cerca para fusionarse.

Lucy (1975) plantea que la reacción del acrosoma se debe a un acondicionamiento de las membranas que ocurre durante la incubación de los espermios. Este acondicionamiento sería la introducción de inestabilidad en las membranas, es decir una perturbación de la bicapa lipídica, lo que aumentaría su fluidez, permitiendo un reordenamiento de las proteínas intrínsecas y la formación de micelas lipídicas. Al encontrarse dos áreas micelares suficientemente cerca, la fusión es inevitable. La hipótesis de la formación de micelas previa a la fusión parece ser confirmada por los experimentos de Conway y Metz (1971) y Gabara, Gledhiel, Croce, Cesarini y Koprotsky (1973). Ellos incubaron espermios de erizo de mar y conejo en presencia de lisofosfolípidos. En los dos casos los espermios sufrieron la reacción del acrosoma. Los lisofosfolípidos desestabilizan las membranas, aumentando la fluidez de éstas y permitiendo así la formación de micelas. Sin embargo, Poste y Allison (1973) plantean que la formación de micelas es poco probable en condiciones fisiológicas y que en caso de producirse sería un cambio tan drástico que provocaría la citolisis.

Por otra parte, Poste y Allison (1973) plantean que las proteínas también tienen un rol importante en la fusión, estableciendo enlaces entre dos membranas. La unión de las proteínas sería posible debido a una hiperpolarización de las membranas que es el resultado del contacto estrecho entre las dos. El acercamiento de las dos membranas podría ocurrir por el mecanismo planteado por Yanagimachi y Usui (1974) y discutido anteriormente, pero es más probable que se produzca espontáneamente al encontrarse dos membranas cuyo radio de curvatura sea suficientemente pequeño.

Dado que la reacción del acrosoma es un fenómeno que debe ocurrir en un momento determinado del proceso de fecundación es probable que exista algún control que asegure que se produzca en el instante preciso. Rogers y Yanagimachi (1975) encontraron que la presencia de glucosa en el medio estabiliza la membrana plasmática o interfiere con el mecanismo de transporte de  $Ca^{++}$ . Pero es más probable que el efecto de la glucosa sobre la capacitación sea de tipo metabólico. Según el trabajo de Miyamoto y Chang (1973) se sabe que el piruvato y el lactato controlan de alguna manera la capacitación. Al aumentar la concentración de glucosa se produce una inhibición competitiva sobre la vía metabólica del lactato y piruvato con el consiguiente retardo en la capacitación lo que sugeriría que la reacción está controlada por el ambiente.

Paso del espermio por las cubiertas oocitarias.

La reacción del acrosoma se considera un requisito para la fecundación porque nunca se ha encontrado un espermio sin reacción del acrosoma dentro del citoplasma ovular. La reacción se produce antes de que el espermio llegue al cúmulo óforo (Bedford, 1972b; Yanagimachi y Mahi, 1976). Austin (1961) propuso que el espermio se abre su paso a través del cúmulo óforo mediante la liberación de hialuronidasa que sería la consecuencia de la reacción del acrosoma. Si la función de la reacción es realmente permitir la liberación de hialuronidasa para que el espermio pueda abrirse paso por el cúmulo óforo es importante que la reacción ocurra en la vecindad del cúmulo óforo y no antes. Efectivamente, la mayoría de los espermios "capacitados" recuperados del útero tienen su acrosoma intacto (conejo: Adams y Chang, 1962; hamster: Yanagimachi y Chang, 1964), mientras que los espermios encontrados en el espacio perivitelino presentan reacción del acrosoma (Austin y Bishop, 1958b).

Una vez que el espermio ha atravesado el cúmulo óforo se encuentra con la zona pelúcida. El espermio se pega en forma tangencial a ella y comienza a entrar abriendo una fisura que se curva en un ángulo amplio hacia el huevo (Austin y Bishop, 1958b). Austin y Bishop (1958 a,b,y c) propusieron la existencia de un agente lítico que permitiría el paso del

espermio por la zona pelúcida. Este agente lítico ha sido aislado del acrosoma de mamíferos y se ha identificado bioquímicamente como una proteinasa (Mc Rorie y Williams, 1974).

Una vez que el espermio llega al espacio perivitelino es rodeado por las microvellosidades del huevo. Estas rodean a todo el espermatozoide pero sólo aquellas que contactan con la membrana plasmática que cubre la región post-acrosómica del espermio se fusionan con éste. (Yanagimachi y Noda, 1970 a y b; Barros y Herrera, 1977). La parte anterior de la cabza del espermio, que está cubierta por la membrana acrosómi-ca interna, es incorporada al citoplasma ovular en una vesí-cula de tipo fagocítico (Barros y Franklin, 1968) debido a que la membrana acrosómica interna no se fusiona con la mem-brana plasmática ovular. Esto puede deberse a la escasa flui-dez que presenta la membrana acrosómica interna lo cual se hi-zo evidente al no encontrar movilidad de receptores que ligan lectina (Nicolson y Yanagimachi, 1974).

En el momento en que se fusionan las membranas gaméti-cas, los gránulos corticales liberan su contenido al espacio perivitelino por fusión de su membrana con la del huevo. Su respuesta fué asociada al bloqueo a la poliespermia (Austin, 1956). Barros y Yanagimachi (1971) demostraron que el conte-nido de los gránulos corticales provoca la reacción de la zo-na, induciéndola experimentalmente en oocitos de hamster no

fecundados con material de gránulos corticales obtenido de huevos fertilizados.

En algunas especies de mamíferos como la rata y el ratón el bloqueo a la poliespermia puede darse a nivel de la zona pelúcida y la membrana plasmática ovular. Mientras que en otras especies el bloqueo es más eficiente a nivel de la zona pelúcida como, por ejemplo: el hamster. En otras especies como el conejo existe sólo la respuesta a nivel de membrana ovular (Austin, 1961). Es importante destacar que en este caso la entrada del espermio provoca un aumento en la densidad de cargas negativas en la superficie vitelina (Cooper y Bedford, 1971); pero hasta el momento no está claro si estos cambios se deben a la ruptura de los gránulos corticales o a la fusión de las membranas gaméticas.

Una vez que se ha producido la fusión de las membranas gaméticas la membrana nuclear desaparece. De este modo la cromatina espermática queda en contacto con el citoplasma ovular, aunque persiste por algún tiempo el material subacrosómico perinuclear. El siguiente evento es la decondensación de la cromatina espermática que comienza en el tercio posterior del núcleo y progresa luego hacia los dos extremos. La parte anterior del núcleo es la última en decondensarse.

Desde hace unos cinco años se ha estado utilizando ventajosamente la técnica de fecundación cruzada in vitro con el

fin de aportar mayor información relacionada al complejo problema de las interacciones gaméticas (Yanagimachi, 1972a; Hanada y Chang, 1972 y 1976; Barros, Berríos y Herrera, 1973; Barros et al., 1978). En todos los casos estudiados se utilizó oocitos maduros a los que se les eliminó la zona pelúcida siendo el objetivo principal de esos trabajos la evaluación de la capacidad fértil de los espermatozoides con prescindencia de un aspecto tan importante como lo es el de la especificidad de la fecundación. Por otra parte la real posibilidad de refecundación in vitro de huevos fecundados in vivo (Barros y Yanagimachi, 1972) así como de los blastómeros de los primeros estados del desarrollo (Usui y Yanagimachi, 1976) nos han movido a realizar un estudio comparativo de huevos de hamster fecundados in vivo y refecundados in vitro con espermios de cobayo y ratón. Estos experimentos se realizarán con el fin de poder establecer si la aparente falta de especificidad de la fecundación de los oocitos de hamster a los que se les remueve experimentalmente la zona pelúcida se modifica con la fecundación. Por otra parte nos interesa determinar si, como resultado de la formación del cigoto (fusión espermio-huevo), es posible detectar cambios a nivel de la superficie del huevo, previos a aquellos que se ponen en evidencia por la refecundación homóloga. Por último nos interesa establecer si el proceso de dispersión de la cromatina espermática es diferente

en la refecundación heteróloga comparada con la fecundación homóloga.

Se presentará evidencia que indica que:

- a) La falta de especificidad que presenta el oocito no fecundado se mantiene después de la fecundación, es decir, tanto el oocito como el huevo fecundado pueden fusionarse con espermios heterólogos.
- b) Mediante la técnica de refecundación heteróloga se pueden detectar modificaciones a nivel de la superficie del huevo que ocurren después de la fecundación y que se expresan por un período de interacción huevo-espermio heterólogo menor que con espermios homólogos.
- c) La dispersión de la cromatina espermática es un proceso de mayor complejidad que lo descrito anteriormente y este proceso no es especie-específico.
- d) El espermio heterólogo refecundante siempre experimenta dispersión de su cromatina cuando hay fusión de membranas gaméticas.

## MATERIALES Y METODOS

### Recuperación de huevos de hamster fecundados.

En estos experimentos se usaron hembras de hamster adultas previamente cicladas según el método de Orsini (1961). En algunos casos las hembras se inyectaron con 25 u.i. de HCG (Human Chorionic Gonadotrophin, Calbiochem), en la tarde del tercer día después de la descarga del post-estro. Dieciseis horas después, las hembras se cruzaron con machos de fertilidad probada o bien se inseminaron artificialmente con espermatozoides obtenidos del epidídimo. En otros casos se usó el mismo procedimiento pero las hembras se indujeron a superovular inyectándolas con 25 u.i. de FMS (Pregnant Mare's Serum Gonadotrophins, Gestyl Organon) en el día de la descarga de post-estro.

A partir de la 4<sup>a</sup> hora post-coito o post-inseminación las hembras se mataron, a intervalos de 1 a 2 horas, por dislocación cervical. De los oviductos se obtuvieron los huevos que se trataron con una solución con 0,01 % de hialuronidasa (Calbiochem) en BMOE-2 (Brinster, 1971), para eliminar las células del cúmulo óoforo. Después de 3 lavados con medio de cultivo los huevos se pusieron en contacto con espermios de hamster capacitados a fin de hacer visible la reacción de zona pelúcida (Barros y Yanagimachi, 1971 y 1972). Los huevos que presentaban reacción de zona se utilizaron para estudios

de refecundación y aquellos que no la presentaban sirvieron de controles para evaluar la capacidad fértil de los espermios heterólogos usados. Los huevos fecundados y no fecundados se trataron en forma separada con una solución de tripsina (Calbiochem) al 0,01 % en BMOC-2 para eliminar la zona pelúcida. Después de 3 lavados en medio de cultivo los huevos se colocaron junto con espermios capacitados de cobayo o ratón.

#### Preparación de los espermios.

Machos adultos de hamster, cobayo y ratón se mataron por dislocación cervical. La cola del epidídimo se disecó y luego se puso en una cápsula de cultivo (Falcon 3001) la que se llenó con aceite mineral. Con una jeringa de tuberculina se agregaron 0,5 ml de BMOC-2 para hamster y ratón y 0,5 ml de BMOC-2 sin albúmina para espermatozoides de cobayo. De estas suspensiones se tomaron  $1 \times 10^6$  espermios los que se incubaron por 3 horas a 37°C en una gota de 100 µl de medio capacitador, la que se cubrió con aceite mineral. El medio capacitador para espermios de hamster y ratón fué una mezcla 1:1 de BMOC-2 y suero sanguíneo humano precalentado a 70°C (Barros y Yanagimachi, 1972). Los espermios de cobayo se capacitaron incubándolos en BMOC-2 por 5 horas a 37°C. En algunas ocasiones los espermatozoides de cobayo se capacitaron instantáneamente utilizando la técnica del portaobjetos descrita por Barros, Berríos y Herrera (1973).

Refecundación in vitro.

Huevos de hamster fecundados in vivo se incubaron in vitro con espermios de cobayo (Fig. 1) o ratón (Fig. 4), por un período de 1 a 1,5 horas a 37°C. Al término de este período, los huevos se lavaron en medio de cultivo fresco, luego se montaron en un porta-objetos y se cubrieron con un cubre-objetos suspendido por un par de hilillos de parafina-vaselina. Se consideraron refecundados sólo aquellos huevos en los que estaban presentes los dos pronúcleos (Fig. 2 y 5) producto de la fecundación y la cola del espermio de hamster (Fig. 3 y 5) (espermio fecundante) además del área de dispersión de cromatina espermática del espermio heterólogo (fig. 3 y 6) (espermio refecundante). También se anotaron las características del pronúcleo del espermio fecundante a fin de correlacionar la refecundación con el estado de fecundación.

En aquellos casos en que la cabeza del espermio de cobayo o ratón no mostraba dispersión de la cromatina, el huevo se consideraba como huevo no refecundado en las observaciones con el microscopio de contraste de fases.

Los oocitos que no se fecundaron in vivo se utilizaron para evaluar la capacidad fértil de los espermatozoides heterólogos que se usaron en los estudios de refecundación.

Preparación del material para microscopía electrónica.

Grupos de huevos fecundados in vivo y refecundados in vitro con espermios de cobayo o ratón se fijaron por 30 minutos en glutaraldehído al 1% en buffer cacodilato (0,25 M, pH 7,3). Luego se incluyeron en pastillas de agar al 2% prolongándose la fijación por un período adicional de 30 minutos al término del cual se lavaron en buffer cacodilato por un período máximo de 15 minutos y se post-fijaron en  $O_3O_4$  al 1% en buffer cacodilato (0,25 M, pH 7,3) por 15 minutos. Después de la fijación en  $O_3O_4$  se lavaron en varios cambios de buffer cacodilato. La deshidratación se realizó en una serie creciente de acetonas, partiendo con acetona al 30%. Finalmente se trasladaron a mezclas de: Spurr (Spurr, 1969) acetona (100 %) 1:2 (v/v); 1:1 (v/v) y Spurr 100 %. Los huevos se incluyeron en Spurr 100 % nuevo y se dejaron polimerizar a 70°C por un período de 8 horas. Cortes plateados o grises se obtuvieron con cuchillo de vidrio en un ultramicrotomo Porter-Blum MT2-B, se montaron en grillas de cobre de 300 mesh y se tiñeron en acetato de uranilo por 20 minutos y citrato de plomo por 15 minutos. Finalmente se observaron en un microscopio electrónico Philips EM 300.

## RESULTADOS

Evolución del pronúcleo del espermio fecundante: definición de los estados del proceso de fecundación.

Huevos de hamster recuperados de hembras cruzadas o in seminadas artificialmente mostraban una variación en la evolución del pronúcleo macho dependiendo del número de horas transcurridas desde la inseminación. Debido a que en una población de huevos la fecundación in vivo no es un fenómeno sincrónico, describiremos las características del pronúcleo macho a los distintos tiempos a los que fueron obtenidos los huevos fecundados, para así correlacionar la refecundación con el estado del proceso de la fecundación.

Los espermatozoides fecundantes observados en huevos re cuperados del oviducto 5 horas después de la inseminación podrían estar en cualquiera de los siguientes estados:

Estado I: espermio fecundante adosado a la superficie del vitelo sin presentar aún dispersión de la cromatina (Fig. 7). Se podía inferir que este espermio ya se había fusionado con la membrana plasmática ovular porque se había producido la ruptura de los gránulos corticales.

Estado II: espermio fecundante con dispersión de la cromatina en la región media de la cabeza persistiendo la región anterior y caudal de ella con cromatina altamente condensada (Fig.8).

Estado III: espermio fecundante con dispersión cromatínica completa apareciendo así una región más clara y homogénea en el citoplasma ovular, región que estaba asociada a la cola del espermio (Fig. 9).

En huevos recuperados 6 a 7 horas después de la inseminación se podían observar dos tipos de pronúcleos:

Estado IV: pronúcleo con un número moderado de nucléolos pequeños (Fig. 10).

Estado V: pronúcleo con nucléolos algo mayores y en mayor cantidad (Fig. 11).

A partir de la octava hora post-inseminación y hasta la 18<sup>a</sup> se observaron fundamentalmente dos tipos de pronúcleos:

Estado VI: pronúcleo con un nucléolo de gran tamaño y 3 ó 4 nucléolos pequeños. (Fig. 12).

Estado VII: pronúcleo con un nucléolo grande acompañado de uno o ningún nucléolo chico (Figs. 13 y 14).

#### Refecundación con espermios de cobayo.

Se recuperó un total de 790 huevos de hamster de hembras cruzadas o inseminadas artificialmente. De estos se habían fecundado in vivo 362 (46 %). Cuando estos huevos se pusieron en contacto in vitro con espermios de cobayo, 99 (27 %) se refecundaron (Tabla I). De los huevos en estado I, II, o III del

proceso de fecundación 10 de 16 (63%) huevos de hamster se refecundaron con espermios de cobayo.

De los huevos en un estado IV o V se refecundó un 61%.

A partir de los estados VI y VII del proceso de la fecundación que corresponden a la octava y novena hora post-inseminación--en las que se obtiene un 37% de refecundación--se observa una disminución gradual en los porcentajes de refecundación hasta que entre 15 y 16 horas post-inseminación (estado VI y VII) ya ningún huevo se refecundó con espermios de cobayo.

Un total de 428 huevos que no se habían fecundado in vivo se utilizaron para evaluar la capacidad fértil de los espermatozoides de cobayo. De este total se fecundaron heterológicamente 256 (60%). Más aún, no se observó una disminución en los porcentajes de fecundación heteróloga a pesar de haber sido recuperados a las mismas horas que los huevos fecundados. Así se puede comprobar que a las 15 - 16 horas post-inseminación ningún huevo fecundado se refecundó, sin embargo, el 100% de los huevos no fecundados in vivo se fecundó heterológicamente.

#### Refecundación con espermios de ratón.

Los resultados de experimentos similares en los que se ensayó el comportamiento de espermatozoides de ratón para re-

fecundar huevos de hamster in vitro son resumidos en la Tabla II. Un total de 313 huevos de hamster se recuperaron de hembras cruzadas o inseminadas artificialmente de los cuales 179 se habían fecundado in vivo. El total de los huevos fecundados in vivo y recuperados en estado I, II, o III, cinco horas post-inseminación, se refecundaron in vitro con espermios de ratón. Seis a siete horas post-inseminación, cuando los huevos se encontraban en estado IV o V del proceso de la fecundación, este porcentaje disminuyó en forma brusca obteniéndose solamente 29% de refecundación. A partir de la novena hora post-inseminación, cuando los huevos se encontraban en estado VI o VII del proceso de la fecundación, ningún huevo fecundado es refecundado in vitro por espermios de ratón.

En los experimentos controles de un total de 133 huevos no fecundados in vivo, 108 (81%) se fecundaron heterológamente in vitro. Entre 14 y 18 horas post-inseminación cuando ningún huevo fecundado se refecundó, el 53% de los huevos no fecundados in vivo se fecundaron con espermios de ratón in vitro.

#### Estudio Ultraestructural

Observaciones de huevos de hamster refecundados in vitro en distintos estados del proceso de fecundación con espermatozoides de cobayo o ratón mostraron que los huevos despro-

vistos de zona pelúcida aparecían rodeados tanto de espermios con acrosoma como de espermios que manifestaban reacción del acrosoma. Sin embargo, sólo los espermatozoides que habían perdido este organelo se encontraban en distintos estados de fusión con el huevo. En la mayor parte de los espermatozoides que habían experimentado la reacción del acrosoma, el segmento ecuatorial había sufrido también el proceso de vesiculación y así, la fusión del espermatozoide se realizó a nivel de la membrana plasmática que recubre la región post-acrosómica. Espermatozoides en estados iniciales de fusión mostraban continuidad entre el citoplasma ovular y todo el material ubicado por dentro de la membrana plasmática espermática y acrosómica interna. Anterior al área de fusión, la membrana plasmática del huevo se adosaba estrechamente a la membrana acrosómica interna, sin llegar a fusionarse con ella (Fig. 15) y constituyendo un canal ciego.

En estados de incorporación espermática más avanzados se podía observar un par de membranas que estaban dentro del citoplasma del huevo (Fig. 17). Estas membranas demarcaban la región anterior del núcleo espermático del citoplasma ovular. De la observación de estos estados de penetración no era posible determinar el origen de cada una de las membranas. La continuidad de las membranas gaméticas se podía tam

bién constatar en la región caudal de la cabeza del espermio (Figs. 25 y 26).

Después de ocurrida la fusión del espermatozoide con el huevo desaparece la membrana nuclear (Figs. 18, 19, 24 y 25). Esto permite poner en evidencia, en algunas regiones, a una banda densa que limita el material nuclear del citoplasma del huevo (Figs. 15, 16 y 27). Por fuera de ésta banda y hacia el lado citoplasmático se observó una serie de cuerpos de un diámetro aproximado de 300  $\text{A}^{\circ}$  (Figs. 21, 22 y 23). En cortes apropiados de huevos refecundados con espermios de ratón se pudo observar un material de una densidad similar a la banda descrita y estrechamente asociado a la cromatina espermática (Fig. 15). El comienzo de la dispersión de la cromatina espermática se insinúa por la aparición de cuerpos de un diámetro aproximado de 0,1 - 0,2  $\mu\text{m}$  que parecen desprenderse de la cromatina y que presentan una densidad similar a ésta (Figs. 15, 16, 22 y 24). En estados más avanzados de incorporación espermática al citoplasma ovular se pudieron observar cuerpos de características similares pero sólo en relación de proximidad con el núcleo espermático o pronúcleo macho (Figs. 19, 22, 23, 26, 29, 30, 31 y 33). Además de éstos cuerpos densos se pudo identificar partículas de aproximadamente 80  $\text{A}^{\circ}$  de diámetro que formaban agregados de 0,2 - 1,2  $\mu\text{m}$  de diámetro. Estos agregados de partículas

aparecían primero por el interior de la región limitada por las dos membranas o por la banda densa y más tarde se las podía identificar en regiones más alejadas e incluso por fuera de la membrana nuclear (Figs. 16, 19, 22, 23, 26, 29, 30, 31 y 33). Simultáneamente con la aparición de los cuerpos densos y los acúmulos de partículas se pudo observar la aparición de finas fibrillas y que corresponden a la clásica descripción de la dispersión de la cromatina (Figs. 18, 19, 23 y 27). La región en donde está ocurriendo este proceso aparece desprovista de los organelos típicos del citoplasma del huevo y es de una textura homogénea (Figs. 19, 20 y 28). Una vez completada la dispersión del núcleo espermático y antes de formarse la membrana del pronúcleo se puede observar parte del perforatorium que persiste en la parte anterior como una región densa (Fig. 28).

En algunos casos pudimos observar un proceso de dispersión de cromatina espermática con persistencia total o parcial de la membrana nuclear (Figs. 29, 30, 32 y 33). En esos casos se observó los cuerpos densos y los acúmulos de partículas por fuera de la membrana nuclear.

En todos los experimentos de refecundación realizados a distintas horas después de la inseminación pudimos observar que una vez producida la fusión espermio-huevo, esta era seguida de dispersión de cromatina espermática.

El espermio refecundante podía fusionarse en cualquier región de la superficie del huevo. Más aún, un segundo espermio refecundante se podía fusionar con la región de la membrana ovular donde minutos antes se había fusionado otro espermio refecundante (Figs. 39 y 40).

## DISCUSION

### FUSION GAMETICA

#### Especificidad

En los últimos 15 años se ha acumulado gran cantidad de evidencia experimental que indica que la zona pelúcida, es a nivel celular, la barrera más importante que evita la fecundación cruzada; aunque existen algunas excepciones tales como los cruces recíprocos entre liebre y conejo (ver Adams, 1974 y Barros, 1979).

La posibilidad de eliminar la zona pelúcida y la conveniente utilización de las técnicas de fecundación in vitro ha permitido un mayor avance en la comprensión de tan importante fenómeno como lo es la fecundación. En 1972 Hanada y Chang obtuvieron por primera vez la fecundación in vitro de oocitos de ratón, rata y hamster con espermatozoides de las mismas especies en combinaciones heterólogas. En estudios posteriores se pudo obtener con éxito la fecundación de oocitos de hamster con espermatozoides de cobayo (Yanagimachi, 1972a; Barros, Berríos y Herrera, 1973), humano (Yanagimachi, Yanagimachi y Rogers, 1976; Barros, González, Herrera y Bustos-Obregón, 1978 y 1979) y cerdo (Imai, Niwa e Iritani, 1977). También se fecundaron oocitos de coneja con espermatozoides de rata y ratón (Hanada y Chang, 1976). Todos estos estudios estuvieron orientados a evaluar la capacidad fértil de los espermatozoides y no al problema de la especificidad de la fecundación. Sin embargo, un estudio

de los resultados de fecundación cruzada parecía indicar que a nivel de la membrana plasmática no existirían restricciones para la entrada de espermatozoides heterólogos debido a las altas tasas de fecundación obtenidas en la mayor parte de los casos. No obstante al considerar al factor tiempo en la fecundación de oocitos sin zona, se pudo constatar que había diferencias importantes entre espermatozoides homólogos y heterólogos. Las fecundaciones homólogas ocurrían en tiempos significativamente menores que las fecundaciones heterólogas (Garcés, Grez, Berríos y Barros, 1977; Barros, 1979); pero los espermatozoides heterólogos podían fecundar porcentajes igualmente altos que los homólogos prolongando los tiempos de incubación de los espermatozoides con los oocitos. El mayor tiempo de interacción gamética que requiere un espermio heterólogo para penetrar al huevo, estaría indicando cierto grado de restricción a nivel de la membrana plasmática ovular a la penetración de espermios heterólogos. Barros (1979) ha sugerido, que a nivel de la membrana plasmática existirían sitios de reconocimiento específicos y no específicos para los espermatozoides, los que permitirían la unión espermio-oocito para una posterior fusión. Los sitios específicos estarían presentes en mayor cantidad que los no específicos, necesitando así mayor tiempo la unión y fusión de espermatozoides heterólogos.

Las características de la membrana plasmática del

huevo en relación a la unión y posterior fusión de nuevos espermatozoides no parecen cambiar como resultado de la fecundación. Así, huevos de hamster fecundados in vivo se han podido refecundar in vitro, previa remoción de la zona pelúcida (Barros y Yanagimachi, 1972). Usui y Yanagimachi (1976) encontraron que las características de la membrana parecían empezar a cambiar recién después del estado de 2 células, en el cual un 60% de los embriones se refecundaban con espermios homólogos, mientras que al estado de 4 células ya sólo lo hacía un 20%. Al estado de 8 células, no era posible obtener refecundación. Al usar la técnica de refecundación con espermios heterólogos se han podido detectar cambios más sutiles a nivel de la membrana plasmática. Estos cambios no eran evidenciables por las técnicas corrientes de fecundación. La evidencia experimental que hemos obtenido indica claramente que el huevo de hamster fecundado puede interactuar por un período de tiempo menor con espermatozoides heterólogos que con espermatozoides homólogos. Más aún, la conducta del huevo fué diferente frente a los espermatozoides de cobayo y ratón. Mientras los primeros podían fusionarse con el huevo hasta 14 horas después de la inseminación, los segundos podían hacerlo sólo hasta 8 horas después. Esta conducta diferente de los espermatozoides frente al huevo fecundado refuerza la noción de un cierto grado de restricción a espermios heterólogos a nivel de la membrana plas-

mática.

Es importante señalar que como resultado de la fecundación la membrana plasmática se constituye en un mosaico al que contribuyen en forma considerable la membrana de los gránulos corticales y en forma casi despreciable las membranas del espermatozoide. Parecería que la contribución de la membrana de los gránulos corticales en el caso del hamster no alteraría significativamente las propiedades de la membrana plasmática para establecer fusión con espermatozoides homólogos. La estructura fluida de la membrana plasmática según el modelo de Singer y Nicolson (1972) podría permitir que sus componentes se entremezclen con aquellos agregados debido a la fusión de los gránulos corticales. Es así, que podríamos hablar más de una disolución de los diferentes componentes de la membrana que de un mosaico. Probablemente, sólo queda como mosaico la región del perforatorium del espermatozoide, lo cual se puede poner en evidencia en fotografías tomadas con el microscopio electrónico. Yanagimachi et al. (1973) aportaron evidencia experimental en apoyo de esta hipótesis. Utilizando la técnica de marcación con hidróxido de fierro coloidal, para poner en evidencia las cargas negativas de superficie, encontraron que toda la membrana plasmática del oocito se teñía intensamente. En espermatozoides, en

cambio, la marca era discontinua, apareciendo intensamente teñida la cola y menos la región acrosómica. La región post-acrosómica que aparecía sin marcarse lo hacía inmediatamente después de producida la fusión espermio-huevo al igual que la membrana de los gránulos corticales que se habían abierto a la superficie.

En el supuesto de la existencia de receptores de espermatozoides específicos de especie y no específicos de especie y, dado que es posible la refecundación, sería necesario aceptar que en la mezcla de los determinantes que llevan a constituir el complejo de la membrana del nuevo fecundado, también se redistribuyen los grupos receptores espermáticos.

Se ha encontrado que los oocitos de hamster y ratón tienen gran abundancia de microvellosidades (Yanagimachi y Noda, 1972; Eager et al., 1976; Wassarman et al., 1977). Austin (1968) propuso que estas microvellosidades tendrían un papel análogo al filamento acrosómico de los espermatozoides de invertebrados en la fusión gamética. Yanagimachi y Noda (1970a) y Barros y Herrera (1977) aportaron evidencia morfológica que apoyaría esta hipótesis. Sin embargo, Hedford y Cooper (1978) sugieren que la fusión espermio-huevo estaría más bien asociada al espacio intervelloso, debido a que la membrana de esa región tiene mayor fluidez

que la de las microvellosidades, condición esencial para los procesos de fusión de membrana (Lucy, 1975) y las microvellosidades tendrían una densidad de cargas negativas mayor que las regiones intervallosas, lo cual impediría que las membranas gaméticas se acercaran lo suficiente para fusionarse. Sin embargo, Bedford y Cooper piensan que el hamster podría ser un caso especial y las microvellosidades tendrían importancia en la fusión (comunicación personal).

Cualquiera que sea la situación real, la conducta diferente de los espermatozoides de ratón y cobayo con respecto a los espermatozoides de hamster se podría explicar por una reducción gradual de las microvellosidades después de la fecundación con lo que irían disminuyendo las probabilidades de interacción espermio-huevo. La disminución de las microvellosidades tendría como consecuencia la disminución de puntos probables de interacción gamética. Esta pérdida se expresaría en forma más drástica en cuanto a la interacción no específica, dado que una disminución proporcional de los probables puntos de interacción tiene como consecuencia que en valor absoluto disminuirían preponderantemente los sitios de unión no específica. Así, la interacción del huevo con el espermio heterólogo cesaría antes que aquella con los espermatozoides homólogos. Es-

te punto de vista necesita ser confirmado estudiando con microscopía electrónica de barrido la superficie del huevo de hamster a distintos tiempos post-inseminación.

#### Modalidad

El mecanismo por el cual se inicia la fusión gamética ha sido ampliamente debatido (ver Barros, 1977; Bedford y Cooper, 1978) especialmente en cuanto al rol jugado por el segmento ecuatorial del espermatozoide. En la primera descripción de la fusión gamética, Barros y Franklin (1968) describieron una estructura similar a un desmosoma septado en un espermio que se encontraba dentro del citoplasma ovular. Según su interpretación esa estructura podía haberse originado de dos maneras diferentes. Una posibilidad era que al momento de la fusión el segmento ecuatorial se encontrara intacto y por lo tanto la fusión inicial tendría que ocurrir en el límite anterior del segmento ecuatorial, incorporándose éste en forma completa al huevo. La otra posibilidad propuesta fué que al momento de la fusión, el segmento ecuatorial hubiera sufrido vesiculación; en tal caso la fusión inicial sería de origen mixto: membrana acrosómica interna y membrana plasmática ovular. Bedford (1972 a y b), Moore y Bedford (1978) y Bedford y Cooper (1978) opinan que el segmento ecuatorial se incorpora en

forma completa al oocito y por lo tanto el punto de fusión inicial correspondería al extremo anterior del segmento ecuatorial. Este mecanismo se concilia con el requisito de la presencia de una estructura con radio de curvatura menor de  $0.1 \mu\text{m}$  para iniciar un proceso de fusión (Poste y Allison, 1973). Esta estructura correspondería al punto en que la membrana plasmática se hace continua con la membrana acrosómica externa. Bedford (1972 b) presentó evidencia morfológica que muestra espermatozoides de conejo en el espacio perivitelino con el segmento ecuatorial intacto. Sin embargo, es imposible predecir si ese espermio se habría fusionado con el oocito. Recientemente Moore y Bedford (1978) presentaron evidencia en huevos de hamster recién fecundados. Las fotografías muestran pequeñas vesículas dentro del citoplasma ovular en el sitio en donde se produjo la fusión inicial, punto que parece corresponder al límite anterior del segmento ecuatorial. Las vesículas tendrían entonces un doble origen: membrana plasmática espermática y ovular. El otro punto de vista ha sido sustentado por Yanagimachi y Noda (1970a), Barros (1977), Barros y Herrera (1977) y está basado en observaciones de estados iniciales de fusión de espermatozoides en donde se ha producido una vesiculación completa del segmento ecuatorial. En nuestros estudios

hemos visto que tanto en los experimentos de refecundación como en aquellos en que se fecundaron oocitos de cobayo inmaduros, la unión espermio-huevo se hacía entre la membrana plasmática ovular y la membrana plasmática espermática del límite caudal del segmento ecuatorial.

Barros et al. (1979) han propuesto que ambos mecanismos son posibles. Si el segmento ecuatorial está presente, la fusión se iniciará en su límite anterior. Si éste se ha vesiculado puede ocurrir en la parte caudal del segmento ecuatorial. Esto sugiere la existencia de una polarización de la membrana plasmática espermática una vez producida la reacción del acrosoma. Esta hipótesis se apoyaría además en la observación de la fusión que ocurre siempre en sentido ántero-posterior y no a la inversa.

Los espermatozoides heterólogos que refecundaron los huevos mostraron una conducta de membrana que no difería básicamente de aquella encontrada en la fecundación homóloga.

Es importante comentar en este momento la situación encontrada por nosotros en que un espermatozoide refecundante se fusionó en el mismo sitio en que minutos antes había entrado otro. Nunca se ha encontrado que dos espermatozoides se fusionen espontáneamente, por lo tanto encontrar un espermatozoide fusionándose en el mismo sitio que lo hiciera otro implica que la membrana plasmática espermá

tica ya contiene determinantes del huevo o vice-versa, lo que hace posible la fusión (ver discusión anterior). La posición en que se encontraban los espermatozoides y el estado de dispersión de la cromatina espermática hace improbable la posibilidad de fusión simultánea de los 2 espermatozoides. La fusión del espermatozoide en un área relativamente libre de microvellosidades podría explicarse aceptando que el grado de desorganización (Lucy, 1975; Poste y Allison 1973) introducido en la membrana por el primer espermio refecundante sirvió para la segunda fusión.

#### Dispersión de la cromatina espermática

##### Influencia del Citoplasma.

El núcleo espermático es una estructura muy estable debido a que la cromatina se encuentra altamente condensada. Calvin y Bedford (1971 y 1974) postularon que la condensación se mantiene debido a un gran número de puentes disulfuros entre las proteínas de la cromatina y que estos se establecen durante el tránsito de los espermatozoides por el epidídimo. La decondensación cromatínica in vitro requiere tratamientos con soluciones de dodecyl sulfato de sodio (SDS) con ditiotreitól (DDT) o 2 mercaptoetanol (Bedford, Cooper y Calvin, 1972 y Mahi y Yanagimachi, 1975).

Estos reactivos rompen específicamente los enlaces disulfuros. Mahi y Yanagimachi (1975) encontraron además que el núcleo se puede decondensar in vitro en presencia de sulfidos inorgánicos o bases fuertes. Es probable que estos agentes actúen por el pH alto de las soluciones resultantes.

A pesar de la gran estabilidad del núcleo, la dispersión de la cromatina espermática dentro del citoplasma ovular ocurre rápidamente después de la fusión gamética (Barros y Yanagimachi, 1972), lo cual sugiere que en el citoplasma ovular hay un factor decondensante muy activo.

En nuestros estudios de refecundación observamos que los espermatozoides heterólogos siempre podían sufrir decondensación dentro del citoplasma ovular a diferencia de lo descrito por Usui y Yanagimachi (1976) quienes encontraron que en refecundaciones homólogas se podía producir fusión sin dispersión cromatínica cuando el huevo se encontraba en estado de pronúcleos. Es interesante destacar que ellos no encontraron dispersión en huevos refecundados 12 horas post-inseminación, en cambio nosotros encontramos dispersión 13 horas después de la inseminación. Es difícil establecer si esta diferencia es real o aparente, debido a que en el trabajo de Usui y Yanagimachi no se dan detalles precisos sobre la metodología utilizada. La dispersión de

la cromatina espermática que observamos en la refecundación heteróloga no se distingue de aquella observada en fecundaciones homólogas.

Yanagimachi y Usui (1972) y Usui y Yanagimachi (1976) demostraron que en huevos de hamster la decondensación depende del ciclo celular del huevo. Ellos encontraron que el mecanismo decondensante se activa en el momento de la ruptura de la vesícula germinativa, aumentando su actividad progresivamente. En el momento de la ovulación, la actividad decondensante es máxima, decayendo rápidamente después de la fecundación. Antes del primer clivaje se observa un nuevo aumento en la actividad decondensante después del cual cesa definitivamente. Usui y Yanagimachi (1976) sugieren que el factor que provoca la decondensación es sintetizado en el citoplasma, almacenado en la vesícula germinativa y liberado de nuevo después de la ruptura de ésta. Esta posición estaría de acuerdo con nuestros hallazgos que oocitos inmaduros de cobayo no permiten la decondensación de espermios de cobayo y hamster (Rihm y Barros, observaciones no publicadas). Por otra parte, Mahi y Yanagimachi (1976) encontraron que los oocitos inmaduros de perra son capaces de decondensar cromatina espermática, lo cual parece indicar que en el citoplasma de estos oocitos debe estar activo el factor decondensante aún antes de que se produzca

la ruptura de la vesícula germinativa.

A pesar de las diferencias encontradas en la fecundación de oocitos inmaduros de diferentes especies y la refecundación homóloga y heteróloga se puede afirmar que la dispersión nuclear es regida por el citoplasma ovular. Es to implica que el citoplasma tiene la capacidad intrínseca de dispersar el núcleo espermático.

Resultados análogos se han obtenido después de la fusión de eritrocitos de pollo con células Hela , fusión que se realizó de tal manera que a la célula receptora entrara sólo el núcleo del eritrocito que se encontraba inactivo. Este núcleo reanudaba la transcripción y la replicación al encontrarse en el nuevo ambiente. Esta reactivación del núcleo iba acompañado de la decondensación de éste y un flujo masivo de proteínas a él. (Appels, Tallroth, Appels y Ringertz, 1975). La reactivación del núcleo no sólo se debe a que éste se encuentra con un ambiente nuevo, sino a que se encuentra con un citoplasma que normalmente induce la síntesis de ADN y ARN. Thompson y Mc Carthy (1968) encontraron que el núcleo de eritrocito de pollo se podía reactivar in vitro al tratarlo con extracto de citoplasma de células que normalmente tienen activa síntesis de DNA.

El efecto del citoplasma sobre la síntesis nuclear se estudió con mayor detalle con respecto a los ciclos ce-

lulares. Rao y Johnson (1970) encontraron que al trasplantar un núcleo de una célula en período  $G_1$  a una célula en período S, la célula receptora induce un período S en el núcleo trasplantado. Al implantar un núcleo en  $G_2$  a una célula en período S no se induce la síntesis (Ord, 1969). Sin embargo, al implantar un núcleo en período S a una célula en  $G_2$  éste continúa la síntesis (Ord, 1969).

Tanto la reactivación de un núcleo en un citoplasma activo como la inducción de un estado celular en un núcleo implantado a una célula receptora, se ha visto que no es especie-específico, al igual que la dispersión de cromatina espermática en la refecundación heteróloga.

#### Modalidad

En nuestras observaciones ultraestructurales para estudiar los eventos de la refecundación heteróloga encontramos algunos componentes de la dispersión como los cuerpos densos y los acúmulos de material granular que, aunque aparecen en el material fotográfico presentado por otros autores como Yanagimachi y Noda (1970 a y b) y Barros y Franklin (1968), no se habían mencionado antes, a excepción del trabajo de Barros y Herrera (1977) pero en el cual ellos no los interpretan. Es interesante que estos componentes de la dispersión se han encontrado tanto en la fecundación ho-

móloga como en la refecundación heteróloga, sugiriendo que el proceso de dispersión cromatínica es un fenómeno de una complejidad mayor a la descrita hasta el momento y no difiere básicamente en las dos situaciones experimentales mencionadas.

Hasta el momento no se sabe nada acerca del origen y la naturaleza de los componentes descritos pero intentaremos plantear una hipótesis para trabajos posteriores enfocados en el estudio de los cuerpos densos y el material granular.

Los cuerpos densos se han encontrado en una posición tal que parecen desprenderse directamente de la cromatina. En estos casos se podría suponer que el origen de ellos es el núcleo espermático. Más aún, se han encontrado en el área delimitada por la banda densa descrita anteriormente. Sin embargo, cuerpos de apariencia similar también se han encontrado en posición de vecindad con la zona de dispersión e incluso por fuera de la membrana nuclear que circunscribe en algunos casos la zona de dispersión de cromatina. Al encontrar los cuerpos densos en esta última posición poco se puede decir acerca del origen de ellos.

Los acúmulos de material granular también se han encontrado en la zona misma de dispersión de cromatina o en la vecindad de ella lo cual hace bastante difícil decidir

si es material espermático u ovular.

Si tanto los cuerpos densos como el material granular fuesen material espermático habría que aceptar que migran al citoplasma ovular durante la dispersión del núcleo. Además habría que aceptar que estas estructuras son capaces de pasar por la membrana nuclear ya que se han encontrado por dentro y por fuera de dicha membrana en aquellos casos en que se observó dispersión de cromatina en presencia de membrana nuclear. El material granular es suficientemente pequeño para pasar por los poros de la membrana y una vez en el citoplasma ovular se ensamblaría para formar los acúmulos observados. Para la salida de los cuerpos densos se puede postular que podría realizarse por flujo de membrana. Esta suposición se puede hacer sobre la base de la evidencia presentada por Szollosi (1965) para la extrusión de nucléolos de los pronúcleos en huevo de rata, aunque estos nucléolos quedan en vesículas rodeadas de membranas y nosotros no observamos dicha estructura alrededor de los cuerpos densos. El origen ovular nos pareció poco probable debido a que nunca encontramos los cuerpos densos ni el material granular en casos en los que no había dispersión espermática, por ejemplo, la fecundación de oocitos inmaduros. (Rihm y Barros, observaciones no publicadas). La elucidación de este problema requiere mayor investigación.

### CONCLUSIONES

- 1) La falta de especificidad del oocito de hamster, cuya zona pelúcida se ha removido experimentalmente, se mantiene después de la fusión gamética homóloga, lo cual se hace evidente debido a la posibilidad de re-fecundar heterológamente in vitro, huevos fecundados in vivo.
- 2) Como resultado de la fusión gamética homóloga se producen cambios a nivel de la superficie del huevo que pueden ser puestos en evidencia mediante la técnica de refecundación heteróloga debido a que la interacción entre el huevo fecundado y un espermio heterólogo es más breve que con un espermio homólogo. Más aún, el huevo fecundado se comporta de manera diferente frente a dos espermios heterólogos diferentes.
- 3) La fusión de un huevo fecundado con un espermio heterólogo fué siempre seguida de dispersión cromatínica, incluso en estados del proceso de fecundación en los cuales espermios homólogos se fusionan sin experimentar dispersión de su cromatina.

- 4) En el proceso de dispersión cromatínica se ha observado fenómenos que no habían sido descritos anteriormente y cuya interpretación es aún incierta.

## REFERENCIAS

- Adams, C.E. (1974) Species specificity in fertilization. In: Physiology and Genetics of Reproduction, part B (E.M. Coutinho y F. Fuchs, eds.), New York: Plenum Press, pp. 69-79.
- Adams, C.E. y Chang, M.C. (1962) Capacitation of rabbit spermatozoa in the Fallopian tube and in the uterus. J. exp. Zool., 151: 159 - 165
- Appels, R.; Tallroth, E.; Appels, D.M. y Ringertz, N.R. (1975) Differential uptake of protein into the chick nuclei of HeLa x chick erythrocyte heterokaryons. Exp. Cell Res., 92: 70-78
- Austin, C.R. (1951) Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. Austr. J. scient. Res., B4: 581-586
- Austin, C.R. (1952) The "capacitation" of the mammalian sperm. Nature, 170: 326
- Austin, C.R. (1956) Cortical granules in hamster eggs. Exp. Cell Res., 10: 533 - 540
- Austin, C.R. (1961) Fertilization of mammalian eggs in vitro. Inter. Rev. Cytol., 12: 337 - 359
- Austin, C.R. (1968) Ultrastructure of Fertilization. Holt Rinehart y Winston, N.Y.

- Austin, C.R. y Bishop, M.W.H. (1957) Preliminaries to fertilization in mammals. *The Beginings of Embryonic Development*, pp. 71 - 107 (A. Tyler, R.C. von Borstel y C.E. Metz, eds.) American Association for the Advancement of Science, Washington.
- Austin, C.R. y Bishop, M.W.H. (1958a) Some features of the acrosome and perforatorium in mammalian spermatozoa. *Proc. Roy. Soc., London*, B 149: 234 - 240
- Austin, C.R. y Bishop, M.W.H. (1958b) Role of the rodent acrosome and perforatorium in fertilization. *Proc. Roy. Soc., London*, B 149: 241 - 248
- Austin, C.R. y Bishop, M.W.H. (1958c) Capacitation of mammalian spermatozoa. *Nature*, London, 181: 851
- Barros, C. (1968) In vitro capacitation of golden hamster spermatozoa with Fallopian tube fluid of the mouse and rat. *J. Reprod. Fertil.*, 17: 203 - 206
- Barros, C. (1974) Capacitation of mammalian spermatozoa. In: *Physiology and Genetics of Reproduction*, part B (E.M. Coutinho y F. Fuchs, eds), New York: Plenum Press, pp. 3 - 24
- Barros, C. (1977) The fertile mammalian spermatozoon. *Rev. Micr. Electr.*, 4: 107 - 113
- Barros, C. (1979) In vitro cross fertilization: Mammalian sperm competition. *Rev. Micr. Electr.* (en prensa)
- Barros, C. y Austin, C.R. (1967) In vitro fertilization and the sperm acrosome reaction in the hamster. *J. exp. Zool.*, 166: 317 - 324

- Barros, C. y Berríos, M. (1977) Is the activated spermatozoon really capacitated? *J. exp. Zool.*, 201: 65 - 72
- Barros, C. y Franklin, L.E. (1968) Behavior of the gamete membranes during sperm entry into the mammalian egg. *J. Cell Biol.*, 37: C13 - C18
- Barros, C. y Garavagno, A. (1970) Capacitation of hamster spermatozoa with blood sera. *J. Reprod. Fertil.*, 22: 381 - 384
- Barros, C. y Herrera, E. (1977) Ultrastructural observations of the incorporation of guinea-pig spermatozoa into zona-free hamster oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, 49: 47 - 50
- Barros, C. y Yanagimachi, R. (1971) Induction of the zona reaction in golden hamster eggs by cortical granule material. *Nature*, 233: 268 - 269
- Barros, C. y Yanagimachi, R. (1972) Polyspermy - preventing mechanisms in the golden hamster egg. *J. exp. Zool.*, 180: 251 - 266
- Barros, C.; Berríos, M. y Herrera, E. (1973) Capacitation in vitro of guinea-pig spermatozoa in a saline solution. *J. Reprod. Fertil.*, 34: 547 - 549
- Barros, C.; Garavagno, A. y Berríos, M. (1974) What is capacitation? *Excerpta Medica Int. Congr.*, 394: 123 - 127

- Barros, C.; Bedford, J.M.; Franklin, L.E. y Austin, C.R. (1967)  
Membrane Vesiculation as a feature of the mammalian acro-  
some rection. *J. Cell Biol.*, 34: C1 - C5
- Barros, C.; González, J.; Herrera, E. y Bustos-Obregón, E. (1978)  
Fertilizing capacity of human spermatozoa evaluated by  
actual penetration of foreign eggs. *Contraception*, 17:  
87 - 92
- Barros, C.; González, J.; Herrera, E. y Bustos-Obregón, E. (1979)  
Human sperm penetration into zona-free hamster oocytes as  
a test to evaluate the sperm fertilizing ability. *Andro-  
logie* (en prensa)
- Bavister, B.D. (1969) Environmental factors important for *in vitro*  
fertilization in the hamster. *J. Reprod. Fertil.*, 18: 544  
-545
- Bedford, J.M. (1969) Limitations of the uterus in the develop-  
ment of the fertilizing ability (capacitation) of spermato-  
zoa. *J. Reprod. Fertil., Suppl.*, 8: 19 - 26
- Bedford, J.M. (1970a) Sperm capacitation and fertilization in  
mammals. *Biol. Reprod., Suppl.*, 2: 128 - 158
- Bedford, J.M. (1970b) The saga of mammalian sperm from ejaculation  
to syngamy. In: Sonderdruck aus 21. Colloquium der Gesells-  
chaft für biologische Chemie, April, Mosbach, Bade, Germany,  
Springer-Verlag, Berlin, pp.124

- Bedford, J.M. (1972a) Sperm transport, capacitation and fertilization. *Excerpta Medica, Reproductive Biology*, (H. Galin y S. Glasser, eds.) Amsterdam pp. 338 - 392
- Bedford, J.M. (1972b) An electron microscopic study of sperm penetration into the rabbit egg after natural mating. *Amer. J. Anat.*, 133: 213 - 254
- Bedford, J.M. y Cooper, G.W. (1978) Membrane fusion events in the fertilization of vertebrate eggs. In: *Membrane fusion*, (G. Poste y G.L. Nicolson, eds.), Elsevier North-Holland Biomedical Press, pp. 65 - 125
- Bedford, J.M.; Cooper, G.M. y Calvin, H.I. (1972) Post-meiotic changes in the nucleus and membranes of mammalian spermatozoa. *Proc. Int. Symp.: The Genetics of Spermatozoon*, (R.A. Beatty y S. Gluecksohn - Waelsch, eds.), Edinburgh pp. 69 - 89
- Brinster, R.L. (1971) Mammalian Embryo Metabolism. In: *The Biology of the Blastocyst* (R.J. Blandau, ed.) The University of Chicago Press, pp. 303 - 318
- Calvin, H.I. y Bedford, J.M. (1971) Formation of disulphide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *J. Reprod. Fertil., Suppl.*, 13: 65 - 75

- Calvin, H.I. y Bedford, J.M. (1974) Stimulation of actinomycin D-binding to eutherian sperm chromatin by reduction of disulphide bonds. *J. Reprod. Fertil.*, 36: 225 -229
- Chang, M.C. (1951) Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the Fallopian tubes. *Nature*, 168: 697
- Chang, M.C. (1955) Development of fertilizing capacity of rabbit spermatozoa in the uterus. *Nature*, 175: 1036 - 1037
- Chang, M.C. (1958) Capacitation of rabbit spermatozoa in the uterus with special refernce to the reproductive phases of the female. *Endocrinology*, 63: 619
- Chang, M.C. y Sheaffer, D. (1957) Number of spermatozoa ejaculated at copulation, transported into the female tract, and present in the male tract of the golden hamster. *J. Hered.*, 48: 107 - 109
- Collins, F. y Epel, D. (1977) The role of calcium ions in the acrosome reaction of sea urchin sperm. *Exp. Cell Res.*, 106: 211 - 222

Conway, A.F. y Metz, C.B. (1971) A possible role of phospholipase in membrane fusion. In: Proceedings of the 11th Annual Meeting of the American Society of Cell Biologists, pp. 64

Cooper, G.W. y Bedford, J.M. (1971) Charge density change in the vitelline surface following fertilization of the rabbit egg. *J. Reprod. Fertil.*, 25: 431 - 436

Eager, D.; Johnson, M. y Thurley, K. (1976) Ultrastructural studies on the surface membrane of the mouse egg. *J. Cell Sci.*, 22: 345 - 353

Franklin, L.E.; Barros, C. y Fussel, E.N. (1970) The acrosomal region and the acrosome reaction in sperm of the golden hamster. *Biol. Reprod.*, 3: 180 - 200

Gabara, B.; Gledhill, B.L.; Croce, CM.; Cesarini, J.P. y Koprwski, H. (1973) Ultrastructure of rabbit spermatozoa after treatment with Lysolecithin and in the presence of hamster somatic cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 143: 1120 - 1124

Garcés, H.; Grez, M.; Berríos, M. y Barros, C. (1977) Competencia espermática en la fecundación. *Arch. Biol. Med. Exp.* 11: R 141

- Hamner, C.E.; Jennings, L.L. y Sojka, N.J. (1970) Cat  
(*Felis catus*) spermatozoa require capacitation.  
J. Reprod. Fertil., 23: 477 - 480
- Hanada, A. y Chang, M.C. (1972) Penetration of zona-free  
eggs by spermatozoa of different species. Biol.  
Reprod., 6: 300 - 309
- Hanada, A. y Chang, M.C. (1976) Penetration of hamster and  
rabbit zona-free eggs by rat and mouse spermatozoa  
with special reference to sperm capacitation. J.  
Reprod. Fertil., 46: 239 - 241
- Hunter, R.H.F. y Dziuk, P.J. (1968) Sperm penetration of  
pig eggs in relation to the timing of ovulation and  
insimination. J. Reprod. Fertil., 15: 199 - 208
- Imai, H.; Niwa, K. e Iritani, A. (1977) Penetration in vi-  
tro of zona-free hamster eggs by ejaculated boar sper-  
matozoa. J. Reprod. Fertil., 51: 495 - 497
- Iritani, A. y Niwa, K. (1977) Capacitation of bull sperma-  
tozoa and fertilization in vitro of cattle follicular  
oocytes matured in culture. J. Reprod. Fertil., 50:  
119 - 121

- Iwamatsu, T. y Chang, M.C. (1972) Capacitation of hamster spermatozoa treated with rabbit tubal fluid or rabbit and bovine tubal cystics fluids. J. exp. Zool., 182: 211 - 216
- Katz, D.F.; Yanagimachi, R. y Dresdner, R.D. (1978) Movements characteristics and power output of guinea-pig hamster spermatozoa in relation to activation. J. Reprod. Fertil., 52: 167 - 172
- Lucy, J.A. (1975) Aspects of the fusion of cells in vitro without viruses. J. Reprod. Fertil., 44: 193 - 205
- Lui, C.W. y Meizel, S. (1977) Biochemical studies of the in vitro acrosomal reaction inducing activity of bovine serum albumin. Differentiation, 9: 59 - 66
- Mahi, C.A. y Yanagimachi, R. (1973) The effects of temperature, osmolality and hydrogen ion concentration on the activation and acrosome reaction of golden hamster spermatozoa. J. Reprod. Fertil., 35: 55 - 66
- Mahi, C.A. y Yanagimachi, R. (1975) Induction of nuclear decondensation of mammalian spermatozoa in vitro. J. Reprod. Fertil., 44: 293 - 296

- Mahi, C.A. y Yanagimachi, R. (1976) Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes in vitro. J. exp. Zool., 196: 189 - 196
- Mattner, P. (1963) Capacitation of ram spermatozoa and penetration of the ovine egg. Nature, 199: 772 - 773
- Mc Rorie, R. y Williams, W. (1974) Biochemistry of mammalian fertilization. Annual review of Biochemistry, 43: 777 - 803
- Miyamoto, H. y Chang, M.C. (1973) The importance of serum albumin and metabolic intermediates for capacitation of spermatozoa and fertilization of mouse eggs in vitro. J. Reprod. Fertil., 32: 193 - 205
- Moore, H.D.M. y Bedford, J.M. (1978) Ultrastructure of the equatorial segment of hamster spermatozoa during penetration of oocytes. J. Ultrastruct. Res., 62: 110 - 117
- Nicolson, G.L. y Yanagimachi, R. (1974) Mobility and restriction of mobility of plasma membrane lectin-binding components. Science, 184: 1294 - 1296

- Ord, M.J. (1969) Control of DNA synthesis in Amoeba proteus.  
Nature, London, 221: 964 - 966
- Orsini, M.W. (1961) The external vaginal phenomena characterizing the stages of the uterus cycle, pregnancy, pseudo-pregnancy, lactation, and the anestrus hamster, Mesocricetus auratus Waterhouse. Proc. Anim. Care Panel, 11:  
193 - 206
- Poste, G. y Allison, A.C. (1973) Membrane fusion. Biochem.,  
Biophys. Acta, 300: 421 - 465
- Rao, P.T. y Johnson, R.T. (1970) Mammalian cell fusion: studies on the regulation of DNA synthesis and mitosis. Nature, London, 225: 159 - 164
- Rogers, J. y Yanagimachi, R. (1975) Retardation of guinea-pig sperm acrosome reaction by glucose: The possible importance of pyruvate and lactate metabolism in capacitation and the acrosome reaction. Biol. Reprod., 13: 568 - 575
- Singer, S.J. y Nicolson, G.L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science, N.Y., 175:  
720 - 731
- Soupart, P. (1967) Studies on the hormonal control of rabbit sperm capacitation. J. Reprod. Fertil., Suppl., 2: 49-63

- Spurr, A.R. (1969) A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.*, 26: 31-43
- Strauss, F. (1956) The time and place of fertilization of the golden hamster egg. *J. Embriol exp. Morphol.*, 4: 42-56
- Szollosi, D. (1965) Extrusion of nucleoli from pronuclei of the rat. *J. Cell Biol.*, 25: 545 - 562
- Talboth, P.; Summers, R.G.; Hylander, B.L.; Keough, E.M. y Franklin, L.E. (1976) The role of calcium in the acrosome reaction: an analysis using Ionophore A23187. *J. exp. Zool.*, 198: 383 - 392
- Thompson, L.R. y Mc Carthy, B.J. (1968) Stimulation of nuclear DNA and RNA synthesis by cytoplasmic extracts in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 30: 166 - 172
- Toyoda, Y. y Chang, M.C. (1974a) Fertilization of rat eggs in vitro by epididymal spermatozoa and the development of eggs following transfer. *J. Reprod. Fertil.*, 36: 9 - 22
- Toyoda, Y. y Chang, M.C. (1974b) Capacitation of epididymal spermatozoa in a medium with high K/Na ratio and cyclic AMP for the fertilization of rat eggs in vitro. *J. Reprod. Fertil.*, 36: 125 - 134
- Usui, N. y Yanagimachi, R. (1976) Behavior of hamster sperm nuclei incorporated into eggs at various stages of maturation, fertilization and early development. The appearance and dis-

- appearance of factors involved in sperm chromatin decondensation in egg cytoplasm. J. Ultrastruct. Res., 57: 276 - 288
- Wassarman, P.M.; Ukena, T.E.; Josejowicz, N.J. y Karnowski, M.J. (1977) Asymmetrical distribution of microvilli in cytochalasin B - induced pseudoclivage of mouse oocytes. Nature, 265: 742 - 744
- Williams, W.L.; Weinman, D.E. y Hanner, C.E. (1964) Effect of the female reproductive tract on spermatozoa. In: Proceedings of the fifth International Congress on Reproduction, Trento, 3: 367 - 370
- Wooding, F.B.P. (1975) Studies on the mechanism of the hyamine induced acrosome reaction in ejaculated bovine spermatozoa. J. Reprod. Fertil., 44: 185 - 192
- Yanagimachi, R. (1969a) In vitro capacitation of hamster spermatozoa by follicular fluid. J. Reprod. Fertil., 18: 275 - 286
- Yanagimachi, R. (1969b) In vitro acrosome reaction and capacitation of golden hamster spermatozoa by bovine follicular fluid and its fractions. J. exp. Zool., 170: 269 - 280
- Yanagimachi, R. (1970a) The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. J. Reprod. Fertil., 23: 193 - 196

- Yanagimachi, R. (1970b) In vitro capacitation of golden hamster spermatozoa by homologous and heterologous blood sera. Biol. Reprod., 3: 147 - 153
- Yanagimachi, R. (1972a) Penetration of guinea-pig spermatozoa into hamster eggs in vitro. J. Reprod. Fertil., 28: 477 - 480
- Yanagimachi, R. (1972b) Fertilization of guinea-pig eggs in vitro. Anat. Rec., 174: 9 - 20
- Yanagimachi, R. (1975) Acceleration of the acrosome reaction and activation of guinea-pig spermatozoa by detergents and other reagents. Biol. Reprod., 13: 519 - 526
- Yanagimachi, R. y Chang, M.C. (1964) In vitro fertilization of golden hamster ova. J. exp. Zool., 156: 361 - 376
- Yanagimachi, R. y Mahi, C.A. (1976) The sperm acrosome reaction and fertilization in the guinea-pig: a study in vivo. J. Reprod. Fertil., 46: 49 - 54
- Yanagimachi, R. y Noda, Y.D. (1970a) Ultrastructural changes in the hamster sperm head during fertilization. J. Ultrastruct. Res., 31: 465 - 485
- Yanagimachi, R. y Noda, Y.D. (1970b) Physiological changes in the post-nuclear cap region of mammalian spermatozoa: a necessary preliminary to the membrane fusion between sperm

and egg cells. J. Ultrastruct. Res., 31: 486 - 493

Yanagimachi, R. y Noda, Y.D. (1972) Scanning electron microscopy of golden hamster spermatozoa before and during fertilization. Experientia, 28: 69 - 72

Yanagimachi, R. y Usui, N. (1972) The appearance and disappearance of factors involved in sperm chromatin decondensation in the hamster egg. J. Cell Biol., 55: 293a

Yanagimachi, R. y Usui, N. (1974) Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea-pig spermatozoa. Exp. Cell Res., 89: 161 - 174

Yanagimachi, R.; Yanagimachi, H. y Rogers, J. (1976) The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. Biol. Reprod., 15: 471 - 476

Yanagimachi, R; Nicolson, G.L.; Noda, Y.D. y Fujimoto, M. (1973) Electron microscopic observations of the distribution of acidic anionic residues on hamster spermatozoa and eggs before and during fertilization. J. Ultrastruct. Res., 43: 344 - 353

T A B L A I  
=====

HUEVOS DE HANSTER FECUNDADOS IN VIVO  
Y REFECUNDADOS IN VITRO CON ESPERMIOS  
DE COBAYO

Hrs. post- inseminación	Estado de fecundación	Huevos fecundados		Huevos refecundados #		Huevos fecundados #	
		<del>in vivo</del>	Total de <del>nuevos recuperados</del>	<del>in vitro</del>	Huevos <del>fecundados in vivo</del>	<del>in vitro</del>	Huevos <del>no fecundados in vitro</del>
5	I, II, III	16/54	(30 %)	10/16	(63 %)	25/38	(66 %)
6 - 7	IV, V	108/382	(28 %)	66/108	(61 %)	141/274	(51 %)
8 - 9	VI, VII	19/35	(54 %)	7/19	(37 %)	16/16	(100 %)
10 -11	VI, VII	64/131	(49 %)	9/64	(14 %)	50/67	(75 %)
13 -14	VI, VII	63/86	(73 %)	7/63	(11 %)	17/23	(74 %)
15 -16	VI, VII	63/68	(93 %)	0/63	(0 %)	5/5	(100 %)
18	VI, VII	39/44	(89 %)	0/39	(0 %)	2/5	(40 %)

# Con espermios de cobayo

Fig. 1.- Espermios de hamster (H) y cobayo (C) con reacción del acrosoma. Nótese la diferencia en la longitud de la cola de los espermios. X 2100

Fig. 2.- Huevo de hamster fecundado in vivo y recuperado del oviducto. El huevo fué tratado con tripsina para digerir la zona pelúcida e incubado durante 1.5 horas con espermios de cobayo. Nótese los pronúcleos (P) producto de la fecundación. X 770

Fig. 3.- El mismo huevo anterior pero a un distinto plano focal para mostrar la cola del espermatozoide fecundante (flechas) y la zona de dispersión del espermatozoide de cobayo refecundante (R). X 770

=====  
T A B L A II  
=====

HUEVOS DE HAMSTER FECUNDADOS IN VIVO  
Y REFECUNDADOS IN VITRO CON ESPERMIOS  
DE RATON

Hrs. post- inseminación	Estado de fecundación	<del>Huevos fecundados in vivo</del> Total de huevos recuperados	(%)	<del>Huevos refecundados # in vitro</del> Huevos fecundados in vivo	(%)	<del>Huevos fecundados # in vitro</del> no fecundados in vivo	(%)
5	I, II, III	6/51	(12 %)	6/6	(100 %)	45/45	(100 %)
6 - 7	IV, V	28/79	(35 %)	8/28	(29 %)	46/51	(90 %)
8	VI, VII	32/42	(76 %)	5/32	(16 %)	5/10	(50 %)
9 - 10	VI, VII	65/75	(87 %)	0/65	(0 %)	3/10	(30 %)
14 - 18	VI, VII	48/65	(74 %)	0/48	(0 %)	9/17	(53 %)

Con espermios de ratón

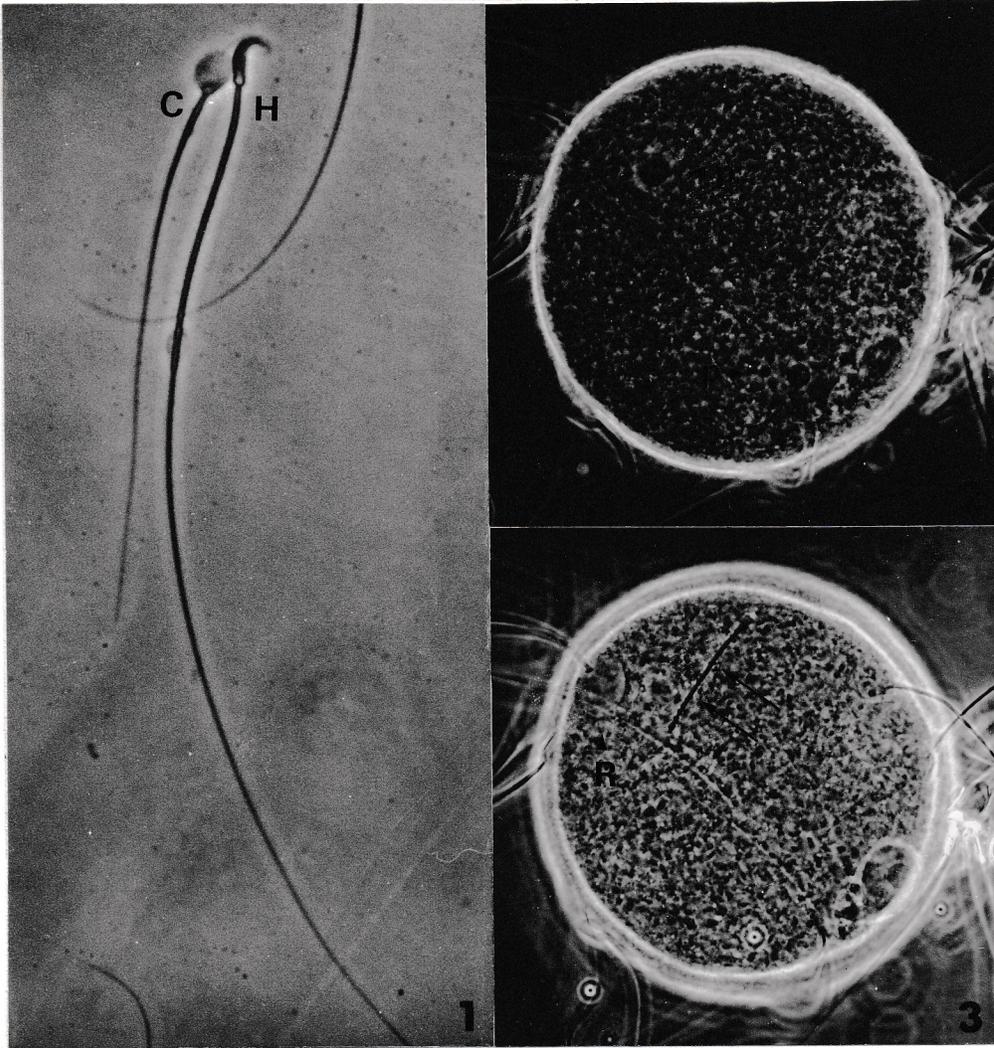
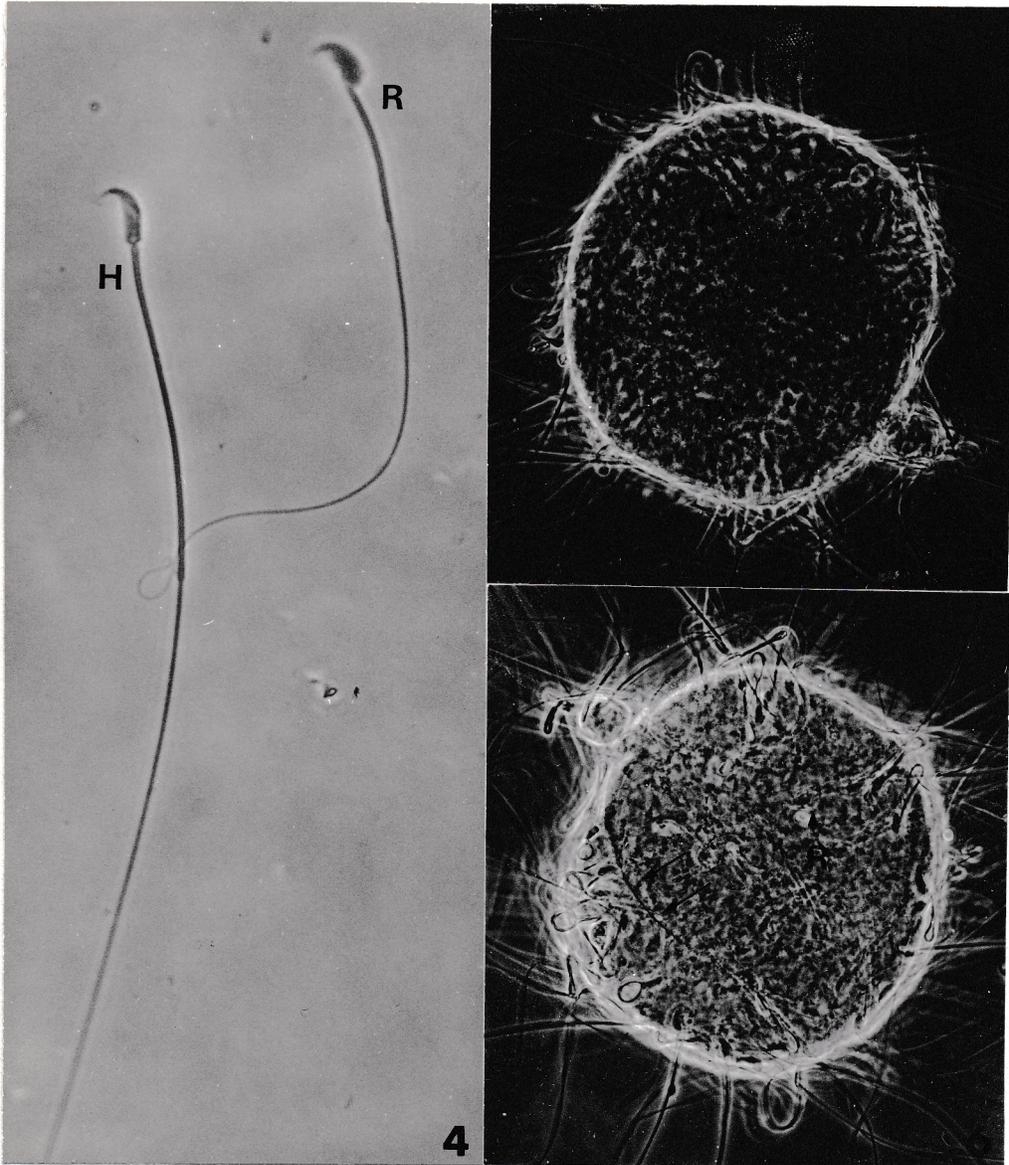


Fig. 4.- Espermios de hamster (H) y ratón (R) reaccionados. Nótese la diferencia en la longitud de la cola de los espermios. X 2100

Fig. 5.- Huevo de hamster fecundado in vivo y recuperado del oviducto. El huevo fué tratado con tripsina para digerir la zona pelúcida e incubado durante 1.5 horas con espermios de ratón. El huevo presenta los pronúcleos (P) producto de la fecundación. X 770

Fig. 6.- El mismo huevo anterior pero a un distinto plano focal, lo cual permite ver la zona de dispersión de cromatina del espermio de ratón refecundante (R) y la cola del espermio fecundante (flechas). X 770



4

Fig. 7.- Estado I: Espermatozoide de hamster adosado a la superficie vitelina de un huevo de hamster (5 hrs. post-inseminación). X 1960

Fig. 8.- Estado II: Espermatozoide de hamster fusionado con un huevo de hamster. El espermio muestra dispersión de la cromatina en la región media de la cabeza (flechas) persistiendo aún cromatina altamente condensada en la parte caudal y anterior del núcleo espermático (5 hrs. post-inseminación). X 1960

Fig. 9.- Estado III: Espermatozoide de hamster con dispersión total de la cromatina espermática después de la fusión con un huevo de hamster. La cola del espermio permanece asociada a la zona de dispersión (5 hrs. post-inseminación). X 1960

Fig. 10.- Estado IV: Pronúcleo macho formado después de la fusión de un espermio de hamster con un oocito de hamster. El pronúcleo presenta un número moderado de nucléolos (6-7 hrs. post-inseminación). X 1960

Fig. 11.- Estado V: Huevo de hamster fecundado en el que se observa un pronúcleo macho con nucléolos algo mayores y en mayor cantidad (6-7 hrs. post-inseminación). X 1960

Fig. 12.- Estado VI: Huevo de hamster fecundado en el que se observa un pronúcleo macho con un nucléolo grande acompañado de varios nucléolos más chicos (8-18 hrs. post-inseminación). X 1960

Fig. 13.- Estado VII: Huevo de hamster fecundado en el que se observa un pronúcleo macho con un nucléolo grande y un nucléolo chico (8-18 hrs. post-inseminación). X 1960

Fig. 14.- Estado VII: Huevo de hamster fecundado en el que se observa un pronúcleo macho con un nucléolo grande (8-18 hrs. post-inseminación). X 1960

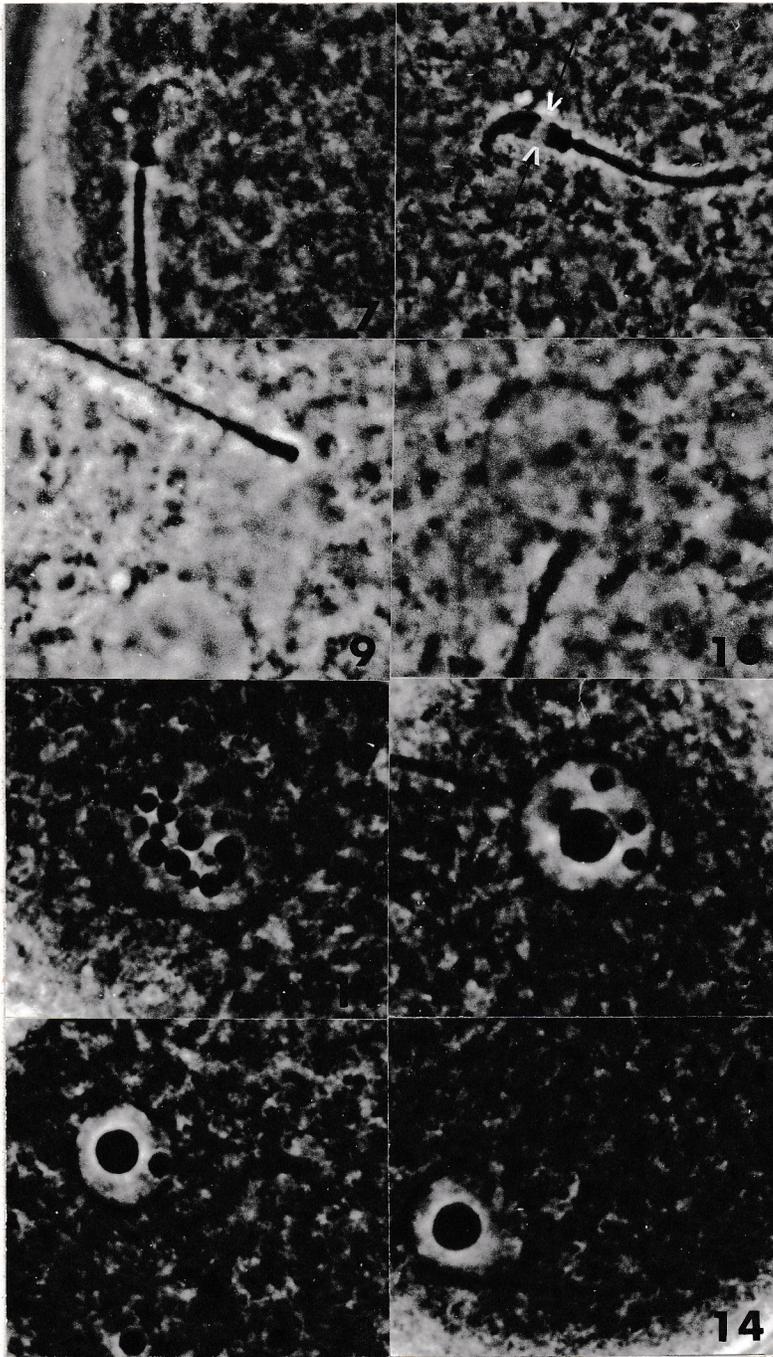


Fig. 15.- Espermatozoide de ratón en un estado inicial de fusión con un huevo de hamster. Se ve una banda densa (b) que separa el material nuclear del espermio del citoplasma del huevo y un material de densidad similar a la banda pero estrechamente asociado a la cromatina espermática (flecha). Además aparecen cuerpos esféricos (e) de densidad similar a la cromatina espermática y que se desprenden de ella. La membrana plasmática (mo) del huevo y la membrana acrosómica interna (ai) están estrechamente adosadas formando un canal ciego.

Fig. 16.- Espermatozoide de ratón fusionado con un huevo de hamster fecundado. Se ven zonas de cromatina condensada (flechas) de las que se desprenden cuerpos densos (e). En la vecindad del lugar de dispersión de la cromatina espermática aparecen cuerpos similares asociados a un acúmulo de material granular (ag). Se ve además una banda densa (b) que separa parcialmente el material nuclear espermático del citoplasma ovular y cortes tangenciales de la cola del espermio (c).

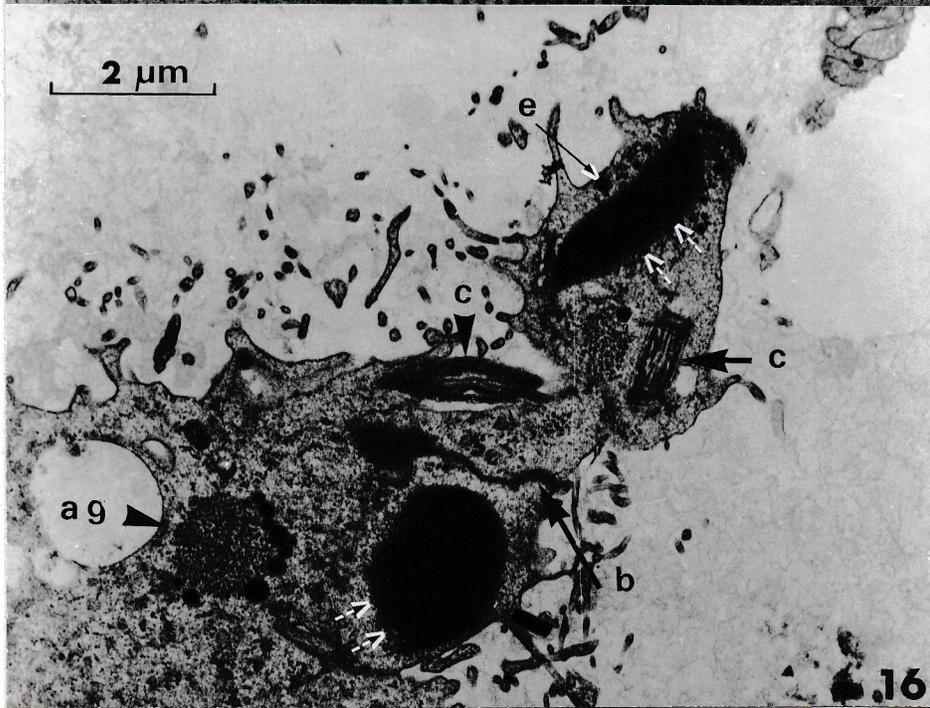
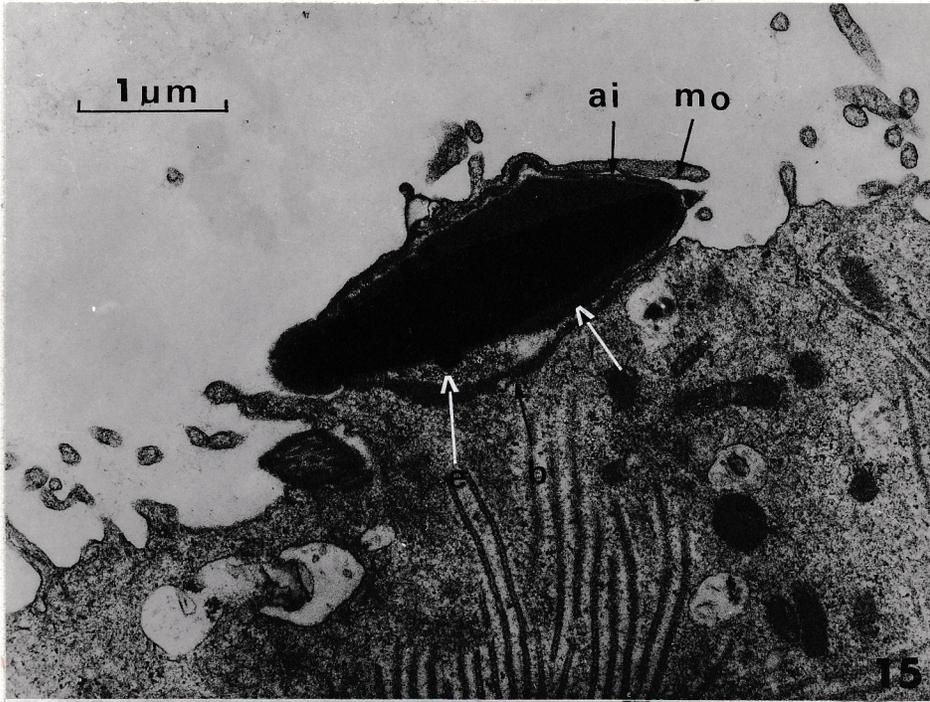


Fig. 17.- Espermatozoide de ratón en un estado de fusión más avanzado con un huevo de hamster fecundado. En el citoplasma del huevo se ve un par de membranas (flechas) que se interponen entre la parte anterior del núcleo espermático en dispersión y el citoplasma.

Fig. 18.- Espermatozoide de ratón fusionado con un huevo de hamster fecundado. Hay comienzo de dispersión de la cromatina espermática en forma de finas fibrillas (flechas). La membrana nuclear no es visible y hay continuidad entre el citoplasma ovular y el material nuclear espermático. En la parte anterior del espermio permanece aún el perforatorium (P).

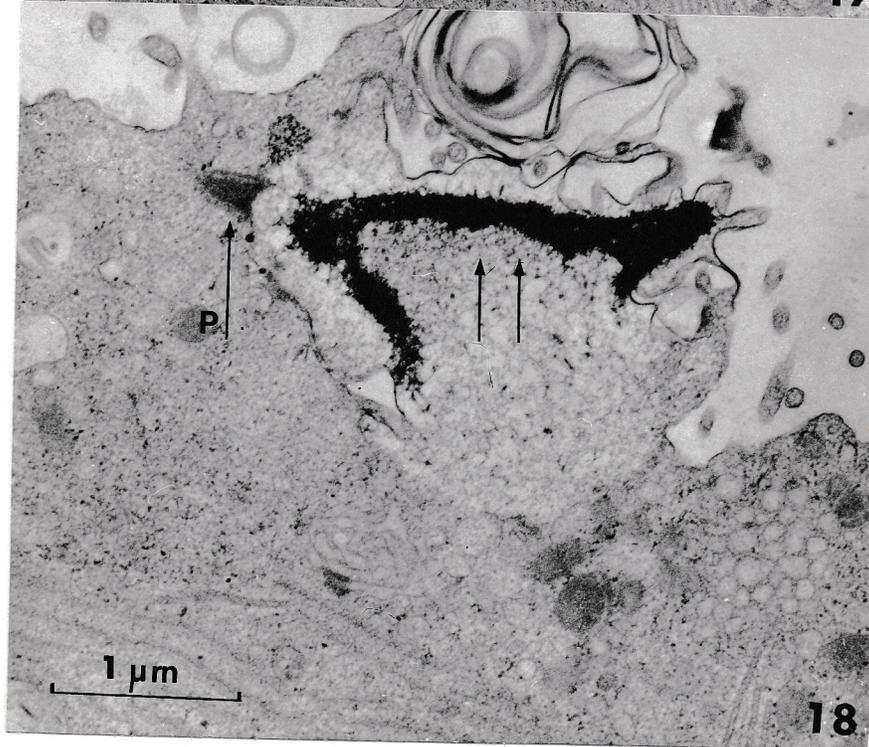
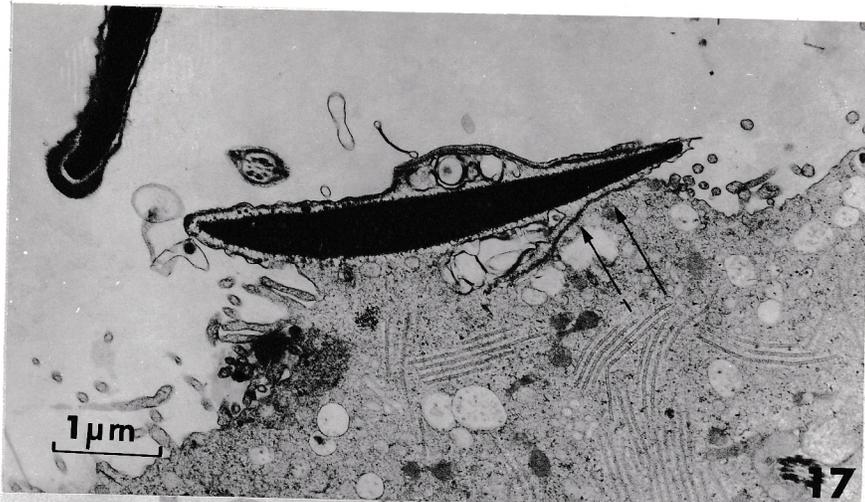


Fig. 19.- Espermatozoide de ratón fusionado con un huevo de hamster fecundado. La membrana nuclear ha desaparecido y hay dispersión de la cromatina espermática.

La región en donde está ocurriendo la dispersión de la cromatina espermática es de una textura homogénea y está desprovista de los organelos citoplásmicos ovulares. En el lugar de la dispersión se ven cuerpos densos (e), asociados a un agregado de material granular (ag).

Fig. 20.- Espermio de ratón en un huevo de hamster fecundado. El espermio presenta dispersión total de su cromatina. La región de la dispersión está desprovista de organelos citoplasmáticos del huevo y tiene una textura homogénea.

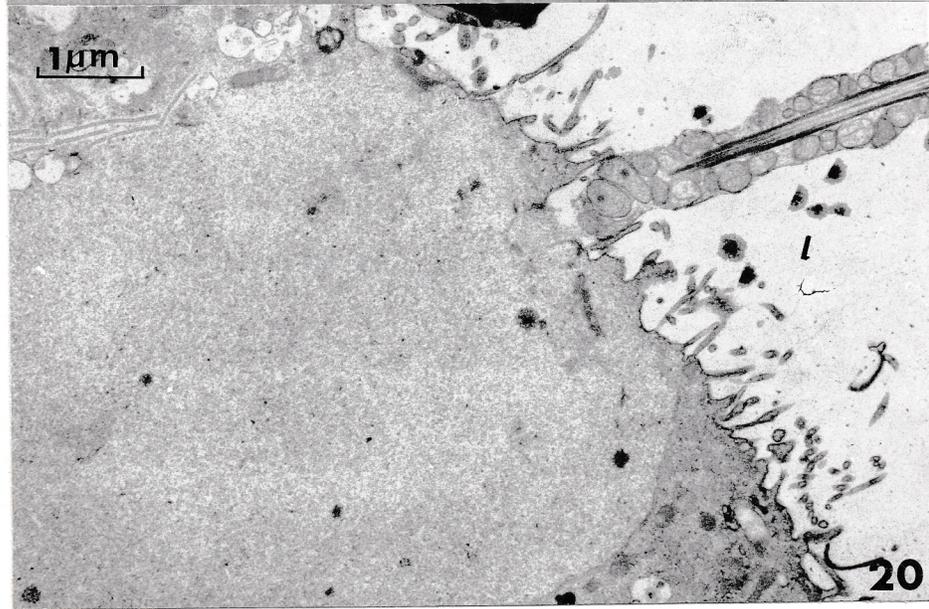
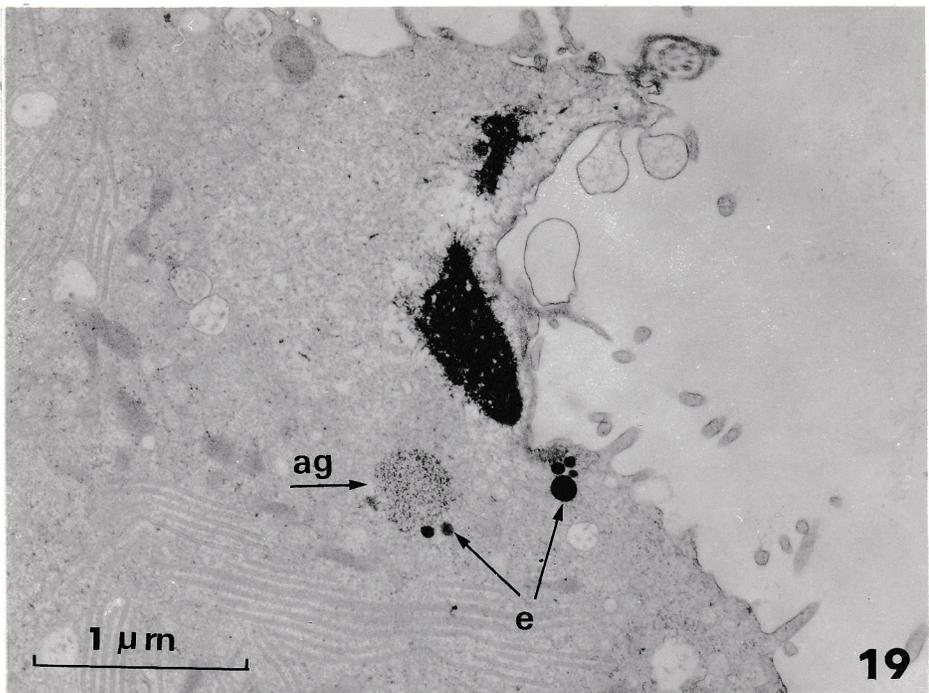


Fig. 21.- Espermio de cobayo fusionado con un huevo de hamster fecundado. La cromatina del espermio se encuentra condensada y rodeada por una banda densa (b). Por el lado del citoplasma ovular se pueden observar pequeños cuerpos (flechas) asociados a la banda densa.

Fig. 22.- Espermio de cobayo fusionado con un huevo de hamster fecundado. Se observa una banda densa (b) que se separa parcialmente a la cromatina espermática del citoplasma ovular y que se encuentra asociada a una serie de pequeños cuerpos (flechas).

Fig. 23.- El mismo espermio de cobayo que en la figura 22 pero a mayor aumento. Esto permite distinguir un par de membranas (flechas) que separan la parte anterior de la cabeza del espermio del citoplasma ovular. Hacia atrás se observa la banda densa (b) y los pequeños cuerpos que se sitúan por el lado del citoplasma ovular. En la parte anterior del espermio persiste aún el perforatorium (P).

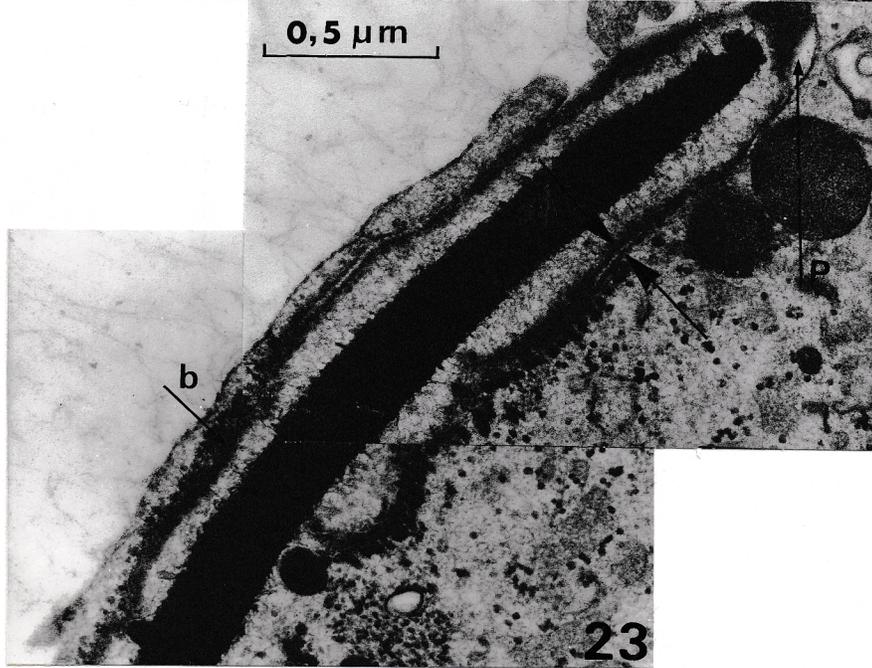
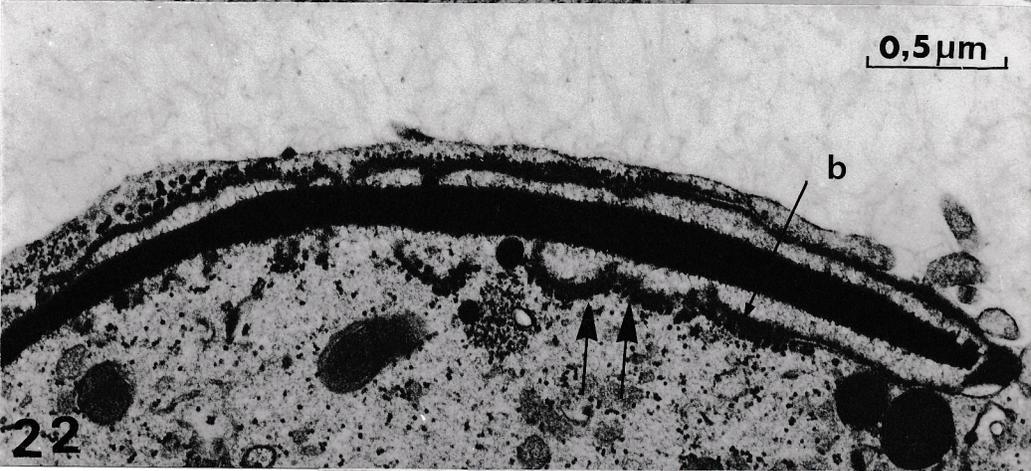
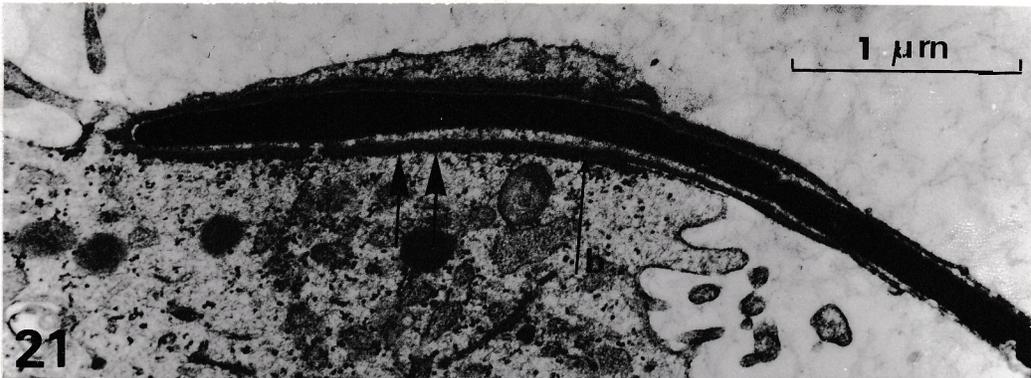


Fig. 24.- Espermatozoide de cobayo fusionado con un huevo de hamster fecundado. Se ven cuerpos (e) de densidad similar a la cromatina espermática y que aparentemente se desprenden de ella.

Fig. 25.- Espermatozoide de cobayo fusionado con un huevo de hamster fecundado. Hay continuidad de membranas gaméticas en la parte caudal de la cabeza del espermio (flechas). La membrana nuclear no es visible.

Fig. 26.- Espermatozoide de cobayo fusionado con un huevo de hamster fecundado. Se puede observar la continuidad de las membranas gaméticas en la parte caudal de la cabeza del espermio. En la vecindad del espermio se pueden observar cuerpos densos (e) asociados con un acúmulo (ag) de material granular.

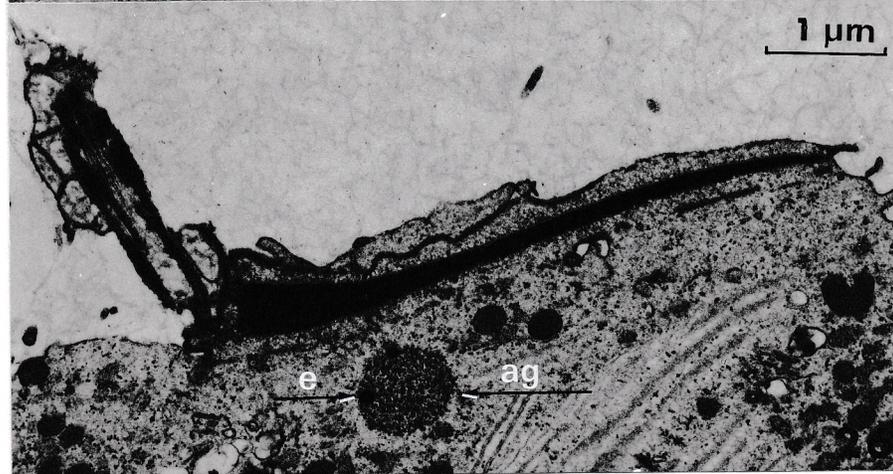
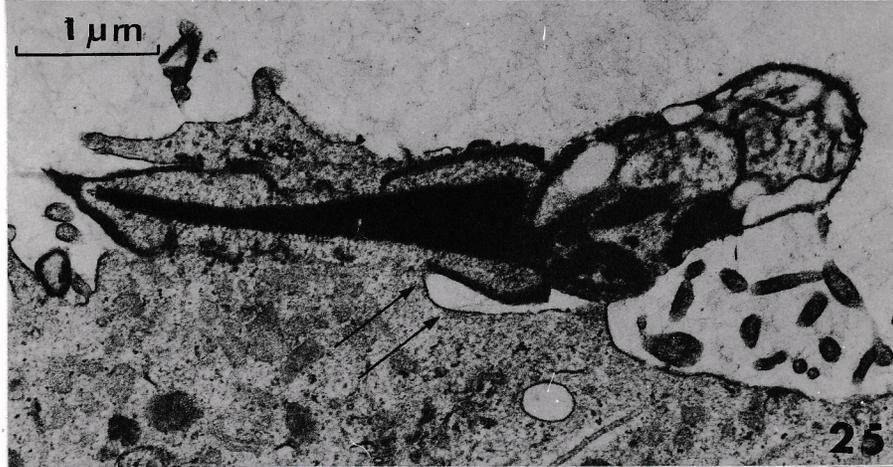
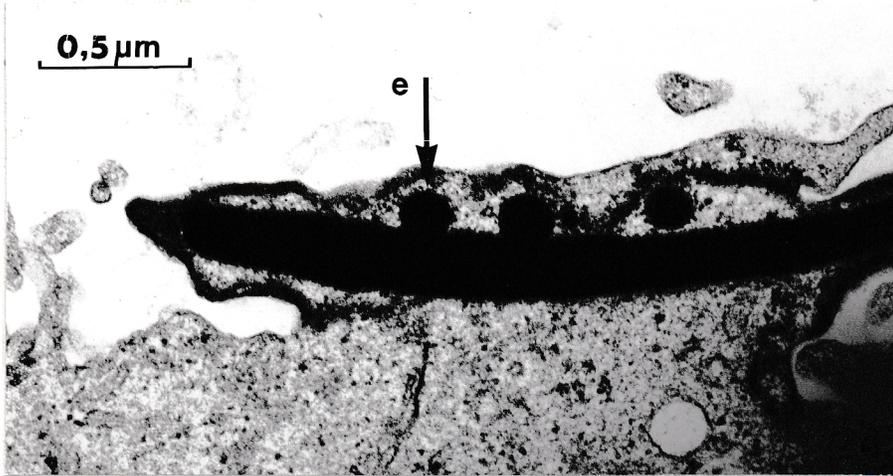


Fig. 27.- Espermatozoide de cobayo fusionado a un huevo de hamster fecundado. Se ve una zona de dispersión de la cromatina espermática separada del citoplasma ovular por una banda de material denso (b).

Fig. 28.- Espermatozoide de cobayo que se ha fusionado con un huevo de hamster fecundado y cuya cromatina se ha dispersado totalmente. En la parte anterior de la cabeza del espermio persiste aún el perforatorium (P) como una región densa.

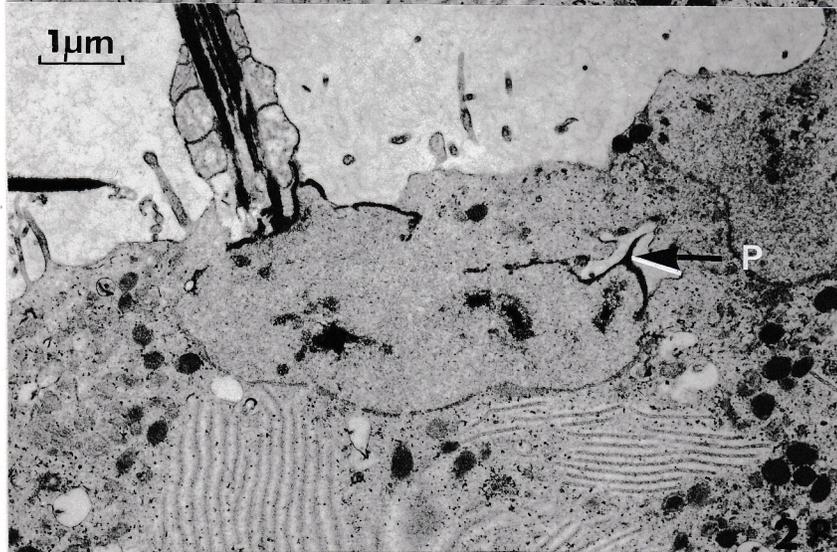
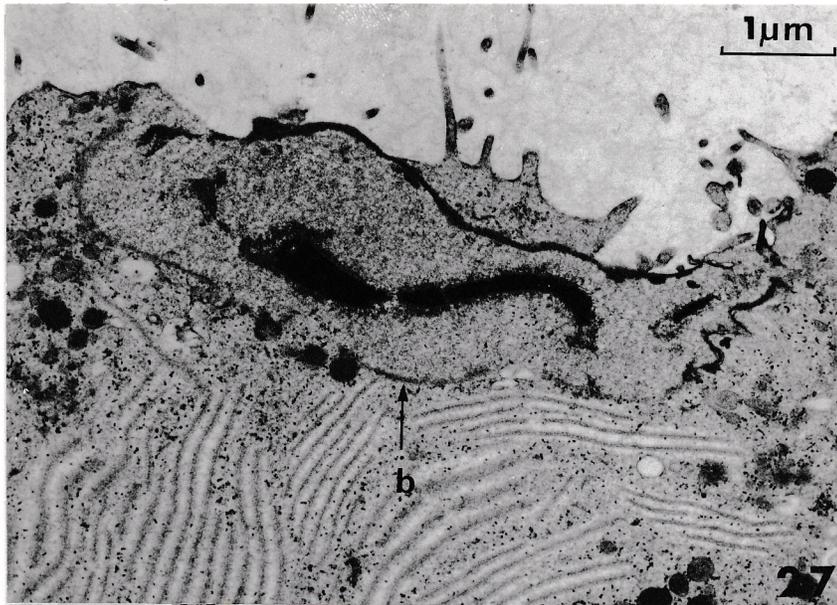


Fig. 29.- Espermio de hamster fecundante en un huevo de hamster. Se ve dispersión de la cromatina espermática en la parte media de la cabeza del espermio. La cromatina de la parte caudal y anterior del núcleo permanece aún condensada (flechas). La cromatina en dispersión se encuentra rodeada por membrana nuclear (mn). Por fuera de ésta se pueden observar cuerpos densos (e) asociados a acúmulos de material granular.

Fig. 30.- Espermio de hamster en un huevo de hamster. Se observa la membrana nuclear (mn) que delimita totalmente la zona de dispersión. Por fuera de la membrana nuclear se observan cuerpos densos (e) de aspecto similar a la cromatina espermática condensada y un agregado de material granular (ag).

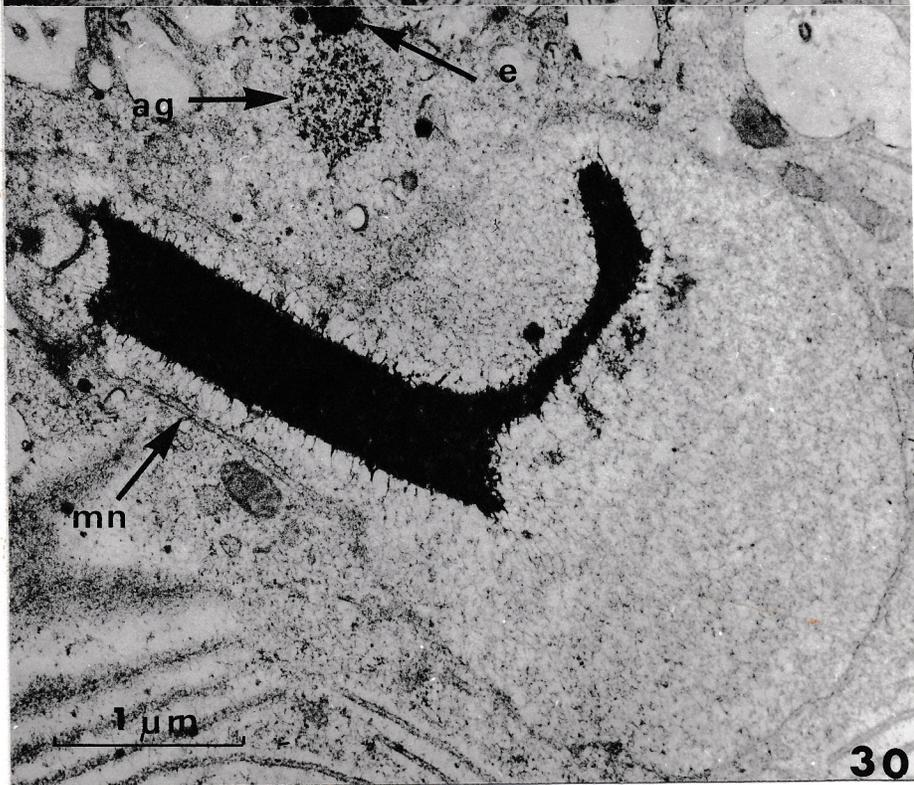
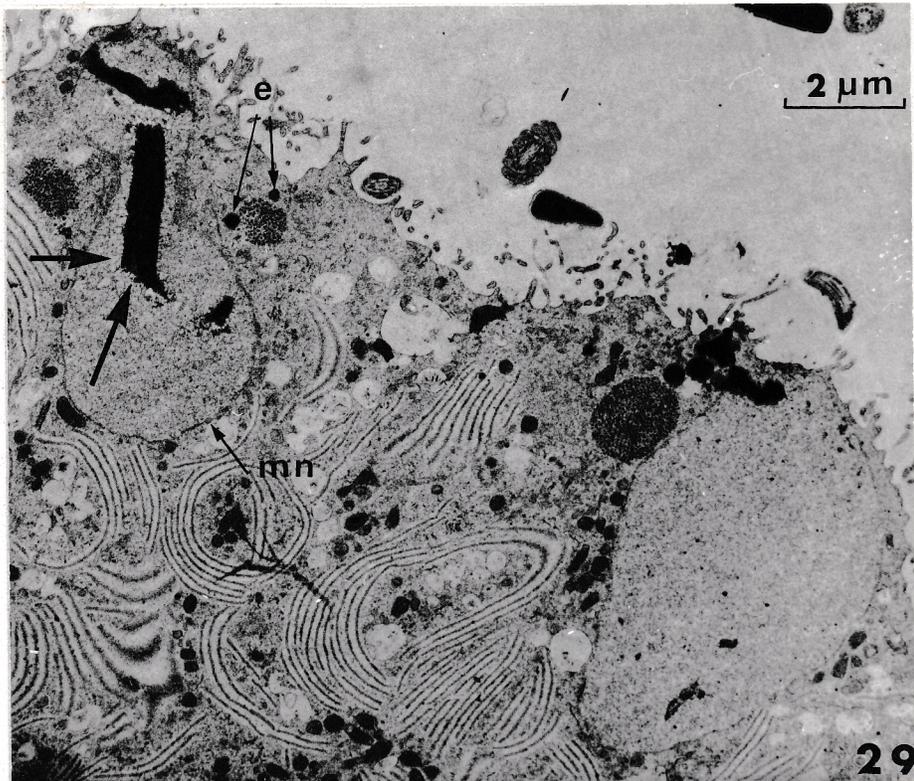


Fig. 31.- Zona de dispersión de cromatina espermática observada en un huevo de hamster fecundado in vivo y refecundado con espermios de ratón. La zona de dispersión de cromatina se encuentra delimitada por membrana nuclear (mn). Se puede observar un cuerpo denso (e) y un acúmulo granular (ag) por fuera de dicha membrana.

Fig. 32.- Espermatozoide de hamster fecundante en un huevo de hamster. Se observa dispersión parcial de la cromatina espermática y la presencia de cuerpos densos (e) que se encuentran en la vecindad inmediata de la cromatina espermática. Además se puede ver que la membrana nuclear (mn) ha persistido en algunas zonas delimitando parcialmente la cromatina dispersa del citoplasma ovular.

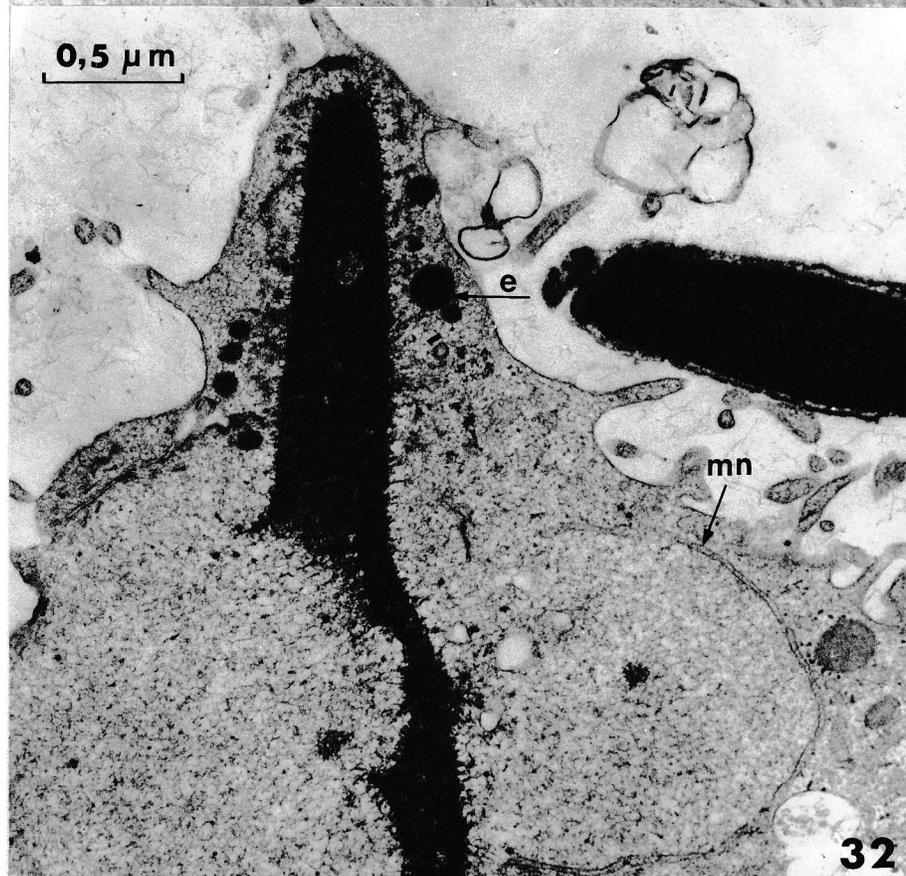
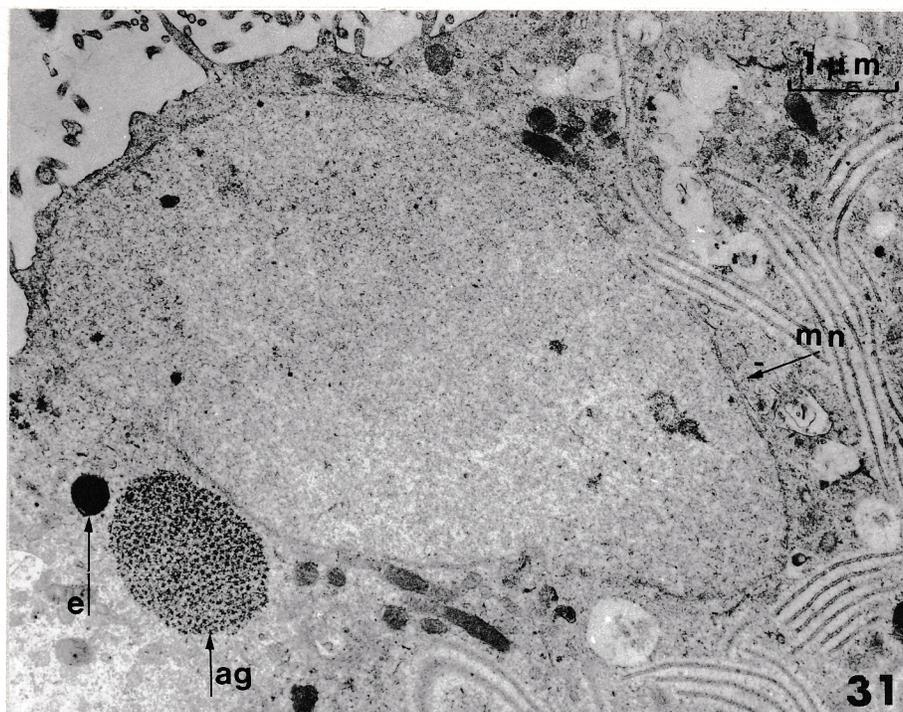


Fig. 33.- Espermatozoide de ratón cuya cromatina se ha dispersado casi totalmente después de la fusión con un huevo de hamster fecundado. La decondensación cromatínica ocurrió con desprendimiento de finas fibrillas (puntas de flecha) y en presencia de la membrana nuclear (mn). Por fuera de ésta se ven cuerpos densos (e) y un acúmulo finamente granular (ag). Además se puede observar un corte transversal de la cola del espermio (flecha).

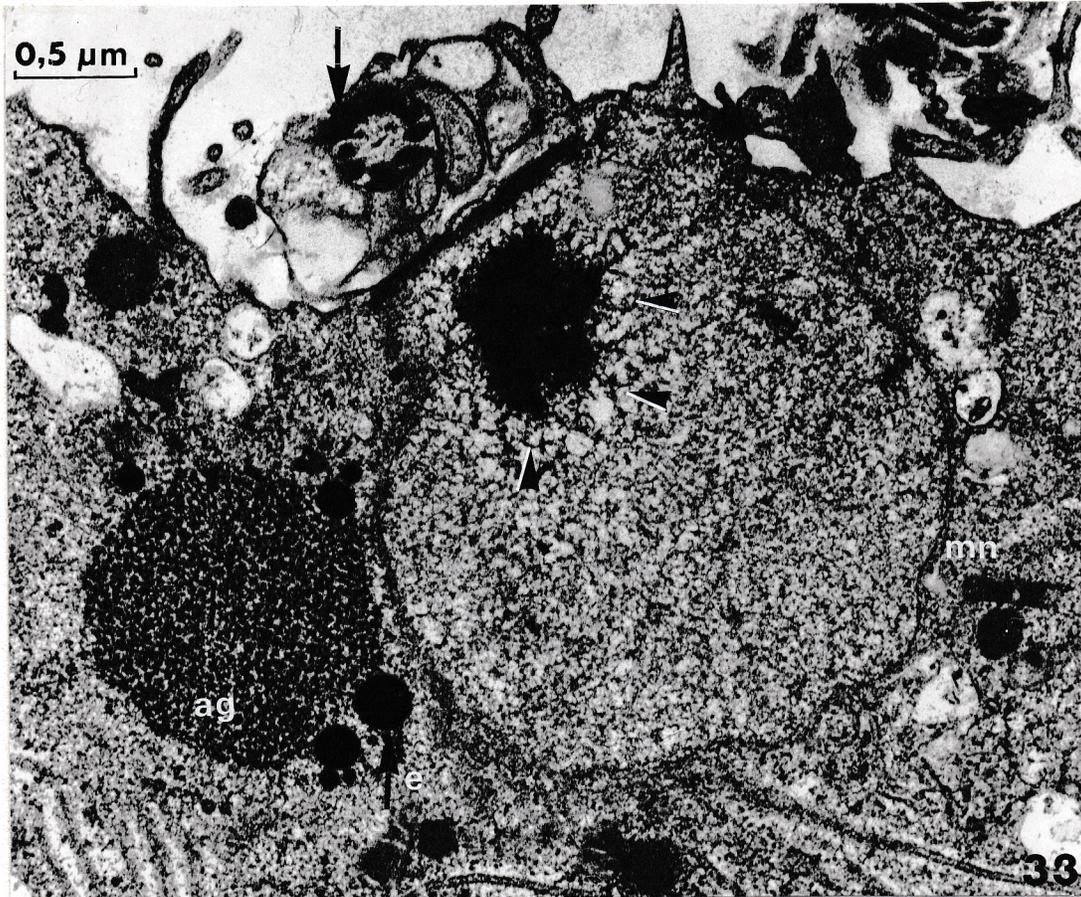


Fig. 34.- Huevo de hamster fecundado que fué penetrado por dos espermatozoides de cobayo en el mismo lugar. En la vecindad se observa un acúmulo de material granular(ag).

Fig. 35.- Zona de dispersión de cromatina de un espermio de ratón en un huevo de hamster fecundado. En el mismo lugar de la fusión se ha fusionado un segundo espermio de ratón que no presenta dispersión de la cromatina espermática y cuyo núcleo se encuentra rodeado de material sub-acrosómico.

