

# Efecto del ácido gama-aminobutírico (GABA) en la capacitación *in vitro* de espermatozoides de mamíferos. El modelo del espermatozoide de carnero

Alberto Valcárcel<sup>1</sup>, Alejandro Gustavo Martínez<sup>2</sup>, Marcelo De las Heras<sup>3</sup>

1. IFER, Buenos Aires, Argentina

2. Unidad de Fertilidad San Isidro, Buenos Aires, Argentina

3. CIRPC, Buenos Aires, Argentina

Reproducción 2009;24:168-181

## Resumen

*El ácido gama-aminobutírico (GABA) es el neurotransmisor inhibitorio más importante en el Sistema Nervioso Central (SNC) de los vertebrados. La existencia de receptores gabaérgicos en el sistema reproductivo (fuera del SNC) ya ha sido establecida y se ha sugerido que los receptores gabaérgicos participarían en la modulación de la función reproductiva. Por otra parte, uno de los eventos intracelulares principales durante la capacitación espermática es la fosforilación de proteínas en residuos tirosina. Nuestros resultados muestran que el GABA posee una acción sobre la capacitación de los espermatozoides en un mecanismo mediado por un receptor de GABA tipo A y que la fosforilación en residuos tirosina podría estar involucrada este mecanismo.*

**Palabras claves.** GABA, capacitación, espermatozoide.

## Summary

*Gamma-aminobutyric acid (GABA) is the most important inhibitory neurotransmitter in the vertebrate Central Nervous System (CNS). The presence of GABAergic receptors has been previously reported in reproductive systems and predicted to participate in the modulation of reproductive function. One of the key intracellular events during capacitation is protein tyrosine phosphorylation. Our results show that GABA exerts an action on sperm capacitation, through a type-A GABA receptor-mediated mechanism, and that tyrosine phosphorylation could be involved in this mechanism.*

**Key words.** GABA, capacitation, spermatozoa.

**Correspondencia:** Valcárcel Alberto  
E-mail: avalcarcel@hotmail.com

## Introducción

La identificación en los fluidos del tracto femenino, del factor o los factores que regulan la capacitación de los espermatozoides podría ayudar en el diseño de un medio químicamente definido para ser utilizado en la fecundación *in vitro* y otras técnicas relacionadas. Entre estos factores, el GABA ha sido recientemente propuesto como un posible modulador de la función espermática.

Por otra parte, distintas evidencias indican que la fosforilación de proteínas participa en el control de la función espermática durante la capacitación, la reacción acrosómica y la fecundación.<sup>1-9</sup> Esto nos indujo a explorar la posibilidad de evidenciar un efecto del GABA sobre este parámetro como un indicador adicional de la capacitación.

En el presente trabajo se presenta el efecto capacitante *in vitro* del GABA en espermatozoides de carnero de acuerdo al ensayo de clortetraciclina (CTC)<sup>10</sup> y a través de la fosforilación en residuos tirosina. Para ello, en una serie de ensayos se determinó el patrón de marcación en espermatozoides de carnero por inmunofluorescencia indirecta con el uso de un anticuerpo antifosfotirosina en muestras no capacitadas y capacitadas. Además, se demuestra que este efecto del GABA es mediado por su interacción con un receptor de tipo GABA<sub>A</sub> (de acción rápida).

## Materiales y métodos

### Incubación de espermatozoides

Alícuotas de semen (100 l) fueron lavados en 4 ml de medio Biggers, Whitten y Wittingham (BWW)<sup>11</sup> sin albúmina sérica bovina (BSA) o sue-

ro fetal bovino (SFB), suplementado con Hepes 10 M y ajustado a un pH de 7,4 con NaOH 0,1 N, en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. A este medio nos referiremos de ahora en adelante como BWW modificado (BWW-m). Las suspensiones espermáticas fueron centrifugadas a 500x g durante 10 minutos en tubos cónicos de 15 ml a temperatura ambiente. El precipitado fue resuspendido en BWW-m hasta llevarlo a una concentración de 108 espermatozoides/ml. Alícuotas (500 l) de esta suspensión fueron mezcladas en viales plásticos de 1 ml con un volumen igual de BWW-m solo (control) o con BWW-m conteniendo GABA, agonistas de GABA o antagonistas de GABA hasta una concentración específica en cada ensayo. Las muestras fueron incubadas a 38,5°C en placas multiviales, bajo atmósfera humidificada de 5% de CO<sub>2</sub> en aire. A intervalos de una hora, durante un período de 4 horas, se tomaron alícuotas de cada muestra y se determinó el grado de capacitación por el ensayo de CTC o se incubaron con ionóforo de calcio A23187 para la inducción de la reacción acrosómica. Como control, todas las muestras fueron analizadas por el método de CTC después del lavado, pero sin incubación.

#### *Análisis de movilidad y viabilidad espermática*

La movilidad de los espermatozoides fue monitoreada antes y después de las incubaciones por medio del Sistema de Análisis Automatizado de Espermatozoides *CellTrak/S TM*, según la calibración puesta a punto para semen de carnero.<sup>12</sup>

Se determinó la integridad de membrana con el uso de diacetato de 6-carboxifluoresceína y yoduro de propidio.

La muestra de semen fue colocada en el extremo superior de 1 ml de solución de *Ficoll 400* (Ficoll 400, 400 g; Hepes 0,477 g; Tris 0,125 g; Fructosa 5,144 g; MgCl<sub>2</sub> 4M 100 l; Sulfato de kanamicina 0,010 g; agua destilada, csp 100 ml) y centrifugada a 15.600xg durante 30 segundos en una microcentrífuga *Eppendorf* Modelo 5414. Los espermatozoides sedimentados fueron suspendidos en 400 µl de citrato de sodio 3% (v/v). Alícuotas de 100 µl de estos espermatozoides fueron adicionadas a 400 µl de solución de trabajo de fluorocromos (9,2 g/ml diacetato de carboxifluoresceína, 5 g/ml yoduro de propidio y 50 mg/l formaldehído).<sup>13</sup> Las incubaciones fueron realiza-

das durante 12 minutos en baño térmico a 30°C en la oscuridad. Alícuotas de 20µl se colocaron sobre portaobjetos de vidrio y se cubrieron con cubreobjeto. Las muestras se observaron en un microscopio *Nikon Optiphot* de epifluorescencia, utilizando los filtros B-2A y G-2A para la carboxifluoresceína y el yoduro de propidio, respectivamente. Se contaron por lo menos 200 células por duplicado para cada muestra. En estas condiciones los espermatozoides con membrana intacta se tiñen de verde, mientras que los que presentan la membrana dañada aparecen rojos.

#### *Inducción de la exocitosis acrosomal por el ionóforo de calcio A23187*

Alícuotas de suspensiones de semen (450 l) incubadas como se describió anteriormente fueron transferidas a viales plásticos de 1 ml que contenían 50 l de ionóforo A23187 50 M en BWW-m, preparado a partir de una solución madre 5 mM en DMSO, hasta obtener una concentración final de A23187 5 M. Las muestras fueron incubadas durante 15 minutos en ionóforo e inmediatamente procesadas para la evaluación de la integridad acrosomal mediante tinción con la lectina *Pisum sativum* (PSA). La integridad acrosomal fue confirmada por el uso de microscopio de contraste de interferencia diferencial (DIC).<sup>14</sup>

Las categorías establecidas para el análisis de la integridad acrosomal son las descritas por Valcárcel y col.<sup>15</sup> Así, los espermatozoides con marcación completa del acrosoma corresponden a espermatozoides que no sufrieron reacción acrosomal y poseen su acrosoma intacto, mientras que los que presentan una débil marcación en el segmento ecuatorial o ausencia de marcación en el acrosoma corresponden a espermatozoides que sufrieron la pérdida del acrosoma. Se observaron al menos 200 espermatozoides por muestra, por duplicado.

#### *Determinación del patrón de unión de lectina PSA*

Se utilizó una modificación del procedimiento descrito por Cross y col.<sup>16</sup> Las suspensiones de espermatozoides fueron centrifugadas a 2.000x g durante 90 segundos en una microcentrífuga *Eppendorf* Modelo 5414 (Hamburgo, Alemania) y el precipitado resultante fue resuspendido y fijado en etanol 95% a 4°C durante 5 minutos. Las suspensiones fueron centrifugadas, lavadas en 1

ml de PBS a temperatura ambiente y resuspendidas en 90 l de PBS. La marcación se realizó por el agregado de 10 l de una solución que contenía 100 g/ml de la lectinas PSA en PBS. La solución fue incubada en baño térmico a 37°C y en oscuridad durante 12 minutos. Luego se lavó por centrifugación con 1 ml de PBS para extraer el exceso de lectina y el precipitado se resuspendió en 50 l de una solución de montaje consistente en 90% (v/v) de glicerol en PBS. Se tomó una alícuota de esta suspensión y se montó en portaobjetos de baja fluorescencia, se cubrió con cubreobjeto y se observaron al menos 150 espermatozoides por portaobjeto, por duplicado, en un microscopio *Nikon Optiphot* de epifluorescencia, utilizando el filtro B-2A. Los espermatozoides con pérdida parcial o total del acrosoma fueron considerados con exocitosis acrosomal.

#### *Ensayo de clortetraciclina (CTC)*

Se preparó una solución de CTC (1 mM) en un *buffer* conteniendo Tris 20 mM, NaCl 130

mM y cisteína 5 mM, pH 7,8. La reacción se inició mezclando 10 l de la muestra de semen (200 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/ml) con 10 l de la solución de CTC, sobre un portaobjetos de baja fluorescencia, a temperatura ambiente. Después de 15 segundos se detuvo la reacción por el agregado de 5 l de una solución de glutaraldehído 12,5% (v/v) preparada en Tris-HCl 2 M, pH 7,8. Las muestras así preparadas fueron cubiertas con un cubreobjetos de 24 x 48 mm y almacenadas en oscuridad a 4°C. Para la evaluación de los patrones de CTC las muestras fueron observadas, dentro de las 24 horas de haber sido preparadas, en un microscopio de epifluorescencia *Nikon Optiphot* utilizando un filtro V-2A. Los patrones de CTC se describen a continuación. La Forma I presenta una distribución homogénea de la fluorescencia en toda la cabeza con una banda más brillante en la región ecuatorial. La Forma II presenta fluorescencia uniforme, pero menor que en la Forma I y no aparece la banda ecuatorial marcada. La Forma III se caracteriza por presentar fluorescencia

**Tabla 1.** Efecto del GABA (20 M) sobre la capacitación de espermatozoides de carnero en función del tiempo. Los espermatozoides fueron incubados en medio BWW-m sólo o conteniendo BSA (4 mg/ml) o GABA 20 M. La capacitación fue evaluada por el porcentaje de Formas I a IV del patrón de marcación de CTC entre 1 y 4 horas de incubación. Los resultados se expresan como Media  $\pm$  DS para cinco eyaculados diferentes. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$  vs sus respectivos controles para cada tiempo de incubación.

	Tiempo (h)	Forma I (%)	Forma II (%)	Forma III (%)	Forma IV (%)	Viables (%)	Móviles (%)
<b>BWW-m</b>	0	85 $\pm$ 1	10 $\pm$ 2	4 $\pm$ 2	0 $\pm$ 0	71 $\pm$ 6	72 $\pm$ 3
	1	82 $\pm$ 3	12 $\pm$ 2	5 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1		
	2	80 $\pm$ 8	10 $\pm$ 7	9 $\pm$ 5	1 $\pm$ 1		
	3	76 $\pm$ 5	15 $\pm$ 6	7 $\pm$ 3	2 $\pm$ 1		
	4	72 $\pm$ 5	19 $\pm$ 4	8 $\pm$ 3	1 $\pm$ 1	64 $\pm$ 6	64 $\pm$ 4
<b>BWW-m + BSA</b>	1	29 $\pm$ 3	58 $\pm$ 6	13 $\pm$ 4	1 $\pm$ 1		
	2	12 $\pm$ 1	65 $\pm$ 3	22 $\pm$ 3**	1 $\pm$ 1		
	3	9 $\pm$ 2	60 $\pm$ 4	29 $\pm$ 3**	3 $\pm$ 1		
	4	5 $\pm$ 1	59 $\pm$ 2	33 $\pm$ 3**	3 $\pm$ 1	64 $\pm$ 5	60 $\pm$ 6
<b>BWW-m + GABA</b>	1	84 $\pm$ 4	12 $\pm$ 4	4 $\pm$ 2	0 $\pm$ 0		
	2	74 $\pm$ 8	10 $\pm$ 8	14 $\pm$ 1*	2 $\pm$ 1		
	3	68 $\pm$ 5	14 $\pm$ 4	15 $\pm$ 2**	3 $\pm$ 1		
	4	54 $\pm$ 2	25 $\pm$ 2	18 $\pm$ 2**	3 $\pm$ 1	63 $\pm$ 6	62 $\pm$ 5

en la porción anterior de la cabeza y no presentar fluorescencia en la región postacrosomal. La forma IV carece de fluorescencia en la cabeza. Todas las muestras se procesaron por duplicado y se contaron no menos de 150 espermatozoides por portaobjeto. No se observó fluorescencia cuando la CTC fue omitida de la preparación.

#### ***Determinación del grado de fosforilación por inmunofluorescencia indirecta***

Se lavaron alícuotas de 10  $\mu$ l de semen en 1 ml de PBS y se fijaron con formaldehído 3%-glutaraldehído 0,1% durante 2 horas a temperatura ambiente. Después del lavado en PBS los espermatozoides fueron permeabilizados por un tratamiento con Triton X-100 0,1% en PBS durante 10 minutos a 37°C y luego lavados en PBS. Para bloquear sitios no específicos las muestras fueron incubadas durante 1 hora en 10% de suero de caballo y lavadas en PBS. El precipitado fue incubado con el anticuerpo monoclonal antifosfotirosina de ratón PY-20 durante 3 horas a temperatura ambiente. Después del lavado en PBS las muestras fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpo anti-IgG conjugado con FITC (10  $\mu$ g/ml) en PBS conteniendo 3 mg/ml BSA y luego lavadas en PBS. Después de la resuspensión en glicerol 90% en PBS las muestras fueron montadas en portaobjetos y observadas en el microscopio de epifluorescencia *Nikon Optiphot* utilizando un filtro B-2A.

Los controles incluyeron incubaciones sin el anticuerpo primario o secundario. En ninguno de los casos se observó fluorescencia.

#### ***Análisis estadísticos***

Los datos fueron analizados utilizando ANOVA y un *test* de múltiples comparaciones Tukey-Kramer a posteriori. Previamente los datos fueron modificados utilizando una transformación angular.<sup>17</sup>

#### **Resultados**

En un primer ensayo se determinó el efecto del GABA en una concentración 20 M sobre la capacitación de espermatozoides de carnero en función del tiempo (hasta 4 horas de incubación). En forma paralela se utilizó un control positivo de la capacitación consistente en la incuba-

ción en BWW-m con el agregado de 4 mg/ml de BSA. Los resultados que se presentan en la Tabla I demuestran un efecto del GABA en la capacitación de espermatozoides (medido a través del incremento de Formas III de CTC) que se pone de manifiesto a partir de las 2 horas de incubación de los mismos y se mantiene constante hasta las 4 horas de incubación.

En ningún caso se observó fluorescencia cuando la CTC fue omitida de la preparación.

Por otra parte, el control utilizado (BWW-m) demostró ser un medio efectivamente no capacitante (no hay diferencias significativas entre el control a tiempo 0 y el control a 4 horas).

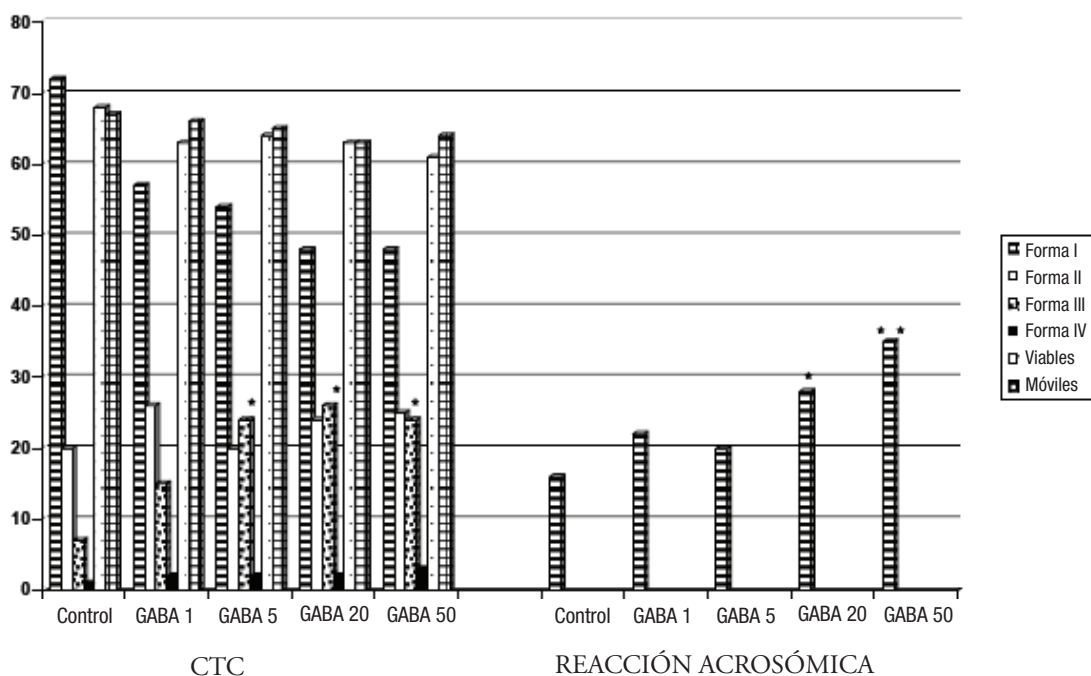
A partir de estos resultados se decidió para los posteriores estudios analizar el efecto de los distintos compuestos a las 4 horas de incubación.

En una segunda serie de ensayos se determinó el efecto de distintas concentraciones de GABA en la capacitación de espermatozoides de carnero medidos a tiempo fijo (4 horas). Los resultados se presentan en la Figura 1.

La incubación en condiciones control no indujo la capacitación de los espermatozoides ( $9 \pm 2$  Formas III de CTC para espermatozoides no incubados vs  $7 \pm 2$  Formas III de CTC para condiciones Control). Del análisis de la Figura 1 se concluye que la acción del GABA aumentó el porcentaje de Formas III de una manera concentración-dependiente. Además, este efecto fue estadísticamente significativo a una concentración de 1  $\mu$ M y máximo a partir de 5  $\mu$ M.

Esta es la evidencia más directa de la acción del GABA sobre la capacitación. No obstante, para reforzar esta idea recurrimos al ensayo de inducción de la reacción acrosómica. Éste se basa en evidencias halladas en otras especies que sugieren que en espermatozoides capacitados la reacción acrosómica ocurre más rápidamente que en los no capacitados (cuando el inductor de la reacción acrosómica es un ionóforo); por lo tanto, la determinación de esta velocidad da una idea adicional del estado de la capacitación. Como se observa en la Figura 1, cuando los espermatozoides previamente incubados con GABA durante 4 horas son tratados con ionóforo A23187 durante 15 minutos, se observa un mayor porcentaje de espermatozoides con exocitosis acrosomal a concentraciones crecientes de GABA. Así, existen diferencias sig-

**Figura 1.** Efecto del GABA a distintas concentraciones sobre la capacitación en espermatozoides de carnero incubado durante 4 horas y sobre el porcentaje de espermatozoides con reacción acrosómica luego de la inducción por A23187. GABA 1 a GABA 50: GABA de 1 a 50  $\mu$ M. n = 5 eyaculados. \*  $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,001$  vs Control.



nificativas en los porcentajes de espermatozoides reaccionados cuando las muestras fueron incubadas con concentraciones 20 M y 50 M de GABA.

Con el objeto de determinar si el efecto observado es mediado por la unión del GABA a un receptor, se realizaron experimentos utilizando agonistas tanto del receptor  $GABA_A$  como del receptor  $GABA_B$  (de acción lenta). Se utilizaron dos concentraciones diferentes (1 M y 10 M) de muscimol (agonista del receptor  $GABA_A$ ) y de baclofen (agonista del receptor  $GABA_B$ ). La capacitación se determinó por el ensayo de CTC luego de 4 horas de incubación y también se determinó la viabilidad y movilidad de las muestras luego de la incubación para descartar un efecto tóxico de estos compuestos sobre los espermatozoides a las concentraciones utilizadas. Los resultados se presentan en la Figura 2.

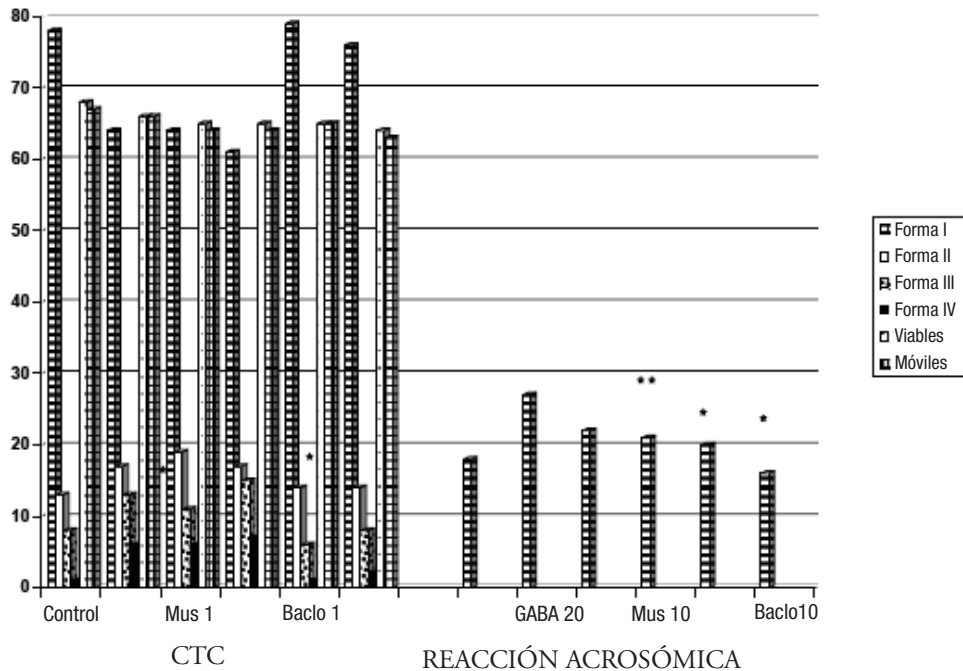
De acuerdo con los resultados obtenidos, el uso de muscimol a una concentración 10 M tuvo un efecto capacitante similar al producido por el GABA a una concentración 20 M. En contraste, el baclofen a la misma concentración no fue efectivo

para imitar el efecto del GABA en la capacitación. Adicionalmente no hubo efecto tóxico al estudiar las dos concentraciones de agonistas utilizadas.

Al analizar el efecto de los agonistas sobre la reacción acrosómica, vemos que el muscimol en las dos concentraciones utilizadas (1 y 10 M) tuvo un efecto semejante al producido por el GABA 20 M, mientras que el baclofen no produjo efecto alguno sobre el porcentaje de espermatozoides reaccionados.

Estos resultados sugieren que el receptor involucrado en el efecto del GABA sobre la capacitación de los espermatozoides de carnero sería un receptor de tipo  $GABA_A$ . Para confirmar esta hipótesis, se realizaron estudios de farmacología del receptor  $GABA_A$ . En el primero de estos estudios se analizó el bloqueo de la acción del GABA por incubación con antagonistas específicos del receptor  $GABA_A$  (bicuculina y picrotoxina). Como se observa en la Figura 3, la coincubación de espermatozoides con GABA y bicuculina o picrotoxina anuló completamente el efecto previamente observado. Además, ninguna de las drogas tuvo algún efecto *per se*, indicando que

**Figura 2.** Efecto del muscimol y baclofen sobre los estadios de capacitación y sobre la reacción acrosómica de espermatozoides de carnero. GABA 20: GABA 20 M; Mus 1 y 10: Muscimol 1 y 10 M; Baclo1 y 10: Baclofen 1 y 10 M. n= 8 eyaculados, \*p < 0,05; \*\*p < 0,001 vs Control.



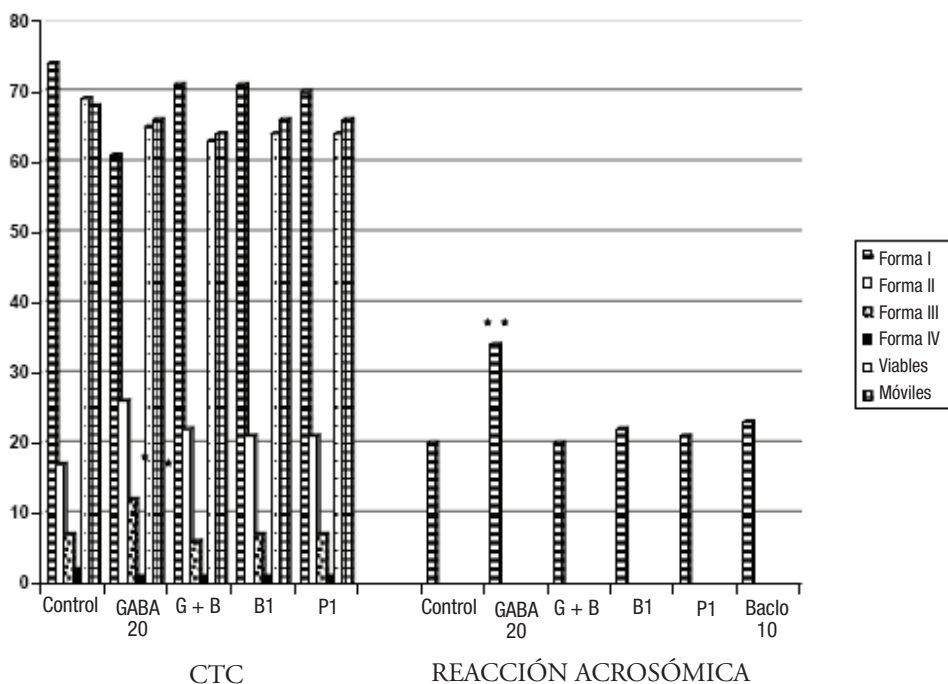
esta inhibición no obedece a una acción tóxica o colateral, sino a un efectivo bloqueo de la acción gabaérgica. En forma análoga a lo hallado en los experimentos anteriores, el bloqueo de la acción del GABA por bicuculina y picrotoxina también se refleja en la inducibilidad de la reacción acrosómica por A23187 (Figura 3).

Una tercera evidencia de la acción del GABA sobre la capacitación se obtuvo por incubación con el compuesto alopregnanolona. Este compuesto es un derivado de la progesterona que se halla presente en forma natural y que potencia el efecto del GABA (es decir, lo hace más efectivo a bajas concentraciones) sin ejercer efecto en ausencia de GABA. Para dilucidar si este mecanismo opera en el espermatozoide, se realizaron incubaciones en presencia de GABA 1  $\mu$ M (es decir, una concentración que no alcanza a ser efectiva) junto a alopregnanolona. Como se observa en la Figura 4, esta baja concentración de GABA no fue efectiva para capacitar espermatozoides. En cambio, cuando el GABA 1  $\mu$ M se asoció a la alopregnanolona, se observó un claro efecto capacitante, indicativo

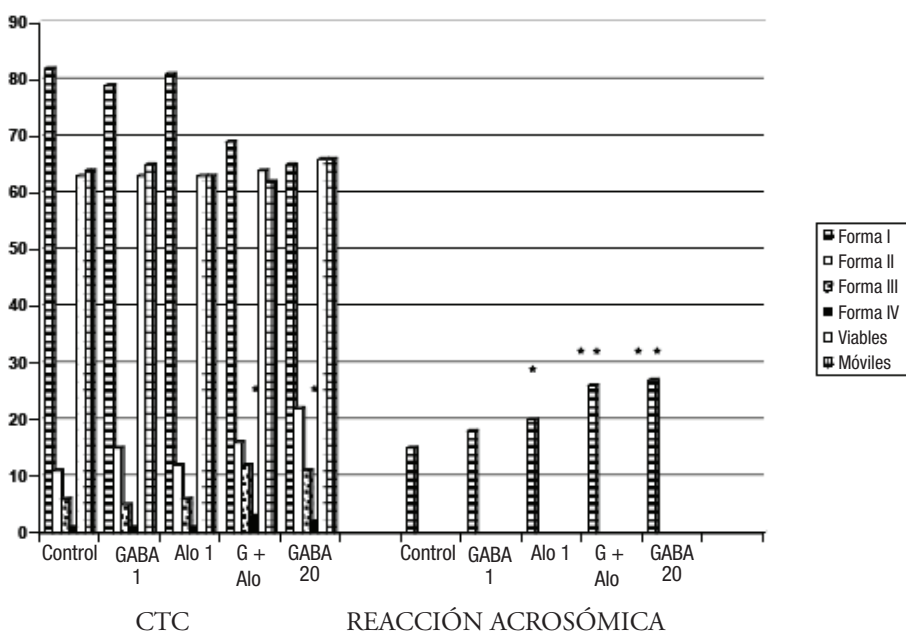
de la acción potenciadora de este compuesto. El mismo efecto se observó cuando se estudió la reacción acrosómica (Figura 4).

Una cuarta evidencia de la acción del GABA sobre la capacitación se obtuvo por incubación con dehidroepiandrosterona sulfato (DHEAS). La DHEAS es un neurotransmisor inhibitorio del GABA en el SNC. Se quiso saber si también inhibe la acción del GABA en el espermatozoide. Para ello se realizó un ensayo en el que se usó como control la incubación en BWW-m. Al mismo tiempo se utilizaron 2 concentraciones de DHEAS (1 y 10 M) y se analizó el efecto inhibitorio sobre la incubación con GABA 20  $\mu$ M. Adicionalmente se midió la viabilidad y motilidad de las muestras para descartar un efecto tóxico de estos compuestos. De los resultados obtenidos se desprende que el efecto capacitante del GABA previamente observado ( $30 \pm 6$  Formas III de CTC) es inhibido por DHEAS a una concentración 10  $\mu$ M ( $21 \pm 6$  Formas III de CTC). Dosis más bajas de DHEAS (1  $\mu$ M) carecen de efecto inhibitorio ( $25 \pm 8$  Formas III de CTC).

**Figura 3.** Efecto del GABA y antagonistas del receptor  $GABA_A$  sobre los estadios de capacitación y la reacción acrosómica de espermatozoides de carnero. Los espermatozoides fueron incubados durante 4 horas en medio BWW-m solo (Control) o conteniendo 20  $\mu M$  GABA (GABA 20), 1  $\mu M$  bicuculina (B1), 1  $\mu M$  picrotoxina (P1) o una combinación de GABA y uno de los antagonistas de GABA.  $n = 6$  eyaculados, \*  $p < 0,05$  vs Control.



**Figura 4.** Efecto del GABA y/o alopregnanolona sobre los estadios de capacitación y reacción acrosómica de espermatozoides de carnero. Los espermatozoides fueron incubados en medio BWW-m solo (Control) o conteniendo GABA 1 o 20  $\mu M$ , alopregnanolona (Alo) 1  $\mu M$  o en combinación de GABA 1  $\mu M$  + Alo 1  $\mu M$ .  $n = 8$  eyaculados, \*  $p < 0,01$ ; \*\*  $p < 0,001$  vs Control.



A fin de reforzar el concepto del papel del GABA en la capacitación, se realizaron experimentos análogos a los descritos determinándose la fosforilación en residuos tirosina por inmunofluorescencia. Para ello fue necesario poner a punto esta técnica en espermatozoides de carnero ya que no había sido descrita previamente en esta especie.

En una primera serie de ensayos se determinó el patrón de marcación indirecta con el anticuerpo antifosfotirosina tanto en espermatozoides no capacitados (incubados en BWW-m, control negativo) como en espermatozoides capacitados (en BWW-m conteniendo BSA 4 mg/ml).

Los patrones de marcación encontrados fueron cuatro:

**Patrón I:** Marcación ecuatorial + flagelo.

**Patrón II:** Marcación ecuatorial + acrosomal + flagelo.

**Patrón III:** Marcación postacrosomal + flagelo.

**Patrón IV:** Marcación completa de cabeza + flagelo.

En la Figura 5 se observan los patrones más abundantes (I y II).

El análisis de la Tabla II muestra que el Patrón I de marcación antifosfotirosina se corresponde con el patrón que presentan los espermatozoides para la fosforilación en tirosina en condiciones no capacitantes. El uso de un medio conteniendo BSA (condiciones capacitantes) puso de manifiesto el aumento del Patrón II de marcación, concordando con lo obtenido para las Formas III de capacitación por CTC. Esto sugiere que la aparición del Patrón II de marcación para antifosfotirosina (marcación ecuatorial + acrosoma + flagelo) se corresponde con la capacitación de los espermatozoides.

Los Patrones III y IV se presentaron esporádicamente con el uso de ambos medios y no representaron un porcentaje mayor al 1% de los espermatozoides marcados en ningún caso, por lo que consideramos despreciable su incidencia y no se considerarán en los futuros ensayos.

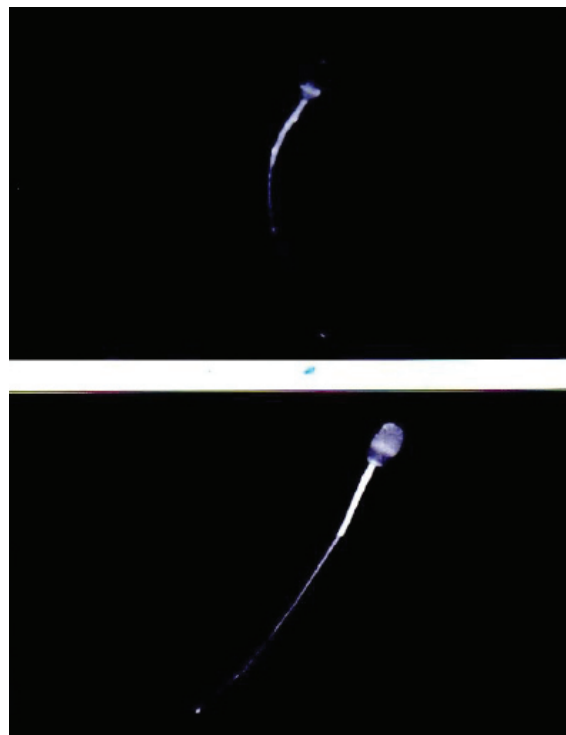
Una vez determinado que el Patrón II de fosforilación en tirosina es el que se corresponde con el estado capacitado determinado por CTC, se procedió a evaluar el efecto del GABA sobre este parámetro. Para ello se incubaron espermatozoides hasta 4 horas en medio BWW-m sólo (no capacitante) o conteniendo GABA 20 M. Así se

aprecia que la incubación con GABA 20 M induce la aparición del Patrón II de fosforilación en una fracción de los espermatozoides, observándose una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control a partir de las 2 horas de incubación.

Con el objeto de establecer la fosforilación de proteínas en residuos tirosina como posible mecanismo molecular involucrado en la capacitación de espermatozoides de carnero por GABA, se realizó el mismo estudio farmacológico utilizado previamente (Figura 6).

De acuerdo con los resultados obtenidos, el uso de muscimol a una concentración 10 M tuvo un efecto sobre el porcentaje de espermatozoides que presentaban fosforilación de proteínas acrosomales y del flagelo similar al producido por el GABA a una concentración 20 M. En ambos casos estos aumentos coinciden con el aumento en el porcentaje de espermatozoides capacitados evi-

**Figura 5.** Patrones de marcación con el anticuerpo antifosfotirosina en espermatozoides de carnero. El Patrón I presenta marca en el segmento ecuatorial y flagelo, y corresponde a espermatozoides no capacitados. El Patrón II presenta marca en el segmento ecuatorial, acrosoma y flagelo, y corresponde a espermatozoides capacitados.



**Tabla 2.** Aparición de Formas III de CTC y patrones de marcación para el anticuerpo antifosfotirosina en un medio control (BWW-m), conteniendo BSA (4 mg/ml) o GABA 20 M. Los resultados se expresan como Media  $\pm$  DS para cinco eyaculados diferentes. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,001$  respecto a sus controles para un mismo tiempo de incubación.

	Tiempo (h)	Forma I (%)	Forma II (%)	Forma III (%)	Forma IV (%)	Viables (%)	Móviles (%)
<b>BWW-m</b>	0	85 $\pm$ 1	10 $\pm$ 2	4 $\pm$ 2	0 $\pm$ 0	71 $\pm$ 6	72 $\pm$ 3
	1	82 $\pm$ 3	12 $\pm$ 2	5 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1		
	2	80 $\pm$ 8	10 $\pm$ 7	9 $\pm$ 5	1 $\pm$ 1		
	3	76 $\pm$ 5	15 $\pm$ 6	7 $\pm$ 3	2 $\pm$ 1		
	4	72 $\pm$ 5	19 $\pm$ 4	8 $\pm$ 3	1 $\pm$ 1	64 $\pm$ 6	64 $\pm$ 4
<b>BWW-m + BSA</b>	1	29 $\pm$ 3	58 $\pm$ 6	13 $\pm$ 4	1 $\pm$ 1		
	2	12 $\pm$ 1	65 $\pm$ 3	22 $\pm$ 3**	1 $\pm$ 1		
	3	9 $\pm$ 2	60 $\pm$ 4	29 $\pm$ 3**	3 $\pm$ 1		
	4	5 $\pm$ 1	59 $\pm$ 2	33 $\pm$ 3**	3 $\pm$ 1	64 $\pm$ 5	60 $\pm$ 6
<b>BWW-m + GABA</b>	1	84 $\pm$ 4	12 $\pm$ 4	4 $\pm$ 2	0 $\pm$ 0		
	2	74 $\pm$ 8	10 $\pm$ 8	14 $\pm$ 1*	2 $\pm$ 1		
	3	68 $\pm$ 5	14 $\pm$ 4	15 $\pm$ 2**	3 $\pm$ 1		
	4	54 $\pm$ 2	25 $\pm$ 2	18 $\pm$ 2**	3 $\pm$ 1	63 $\pm$ 6	62 $\pm$ 5

denciado por el uso de CTC. En contraste, el baflofen 10 M no fue capaz de inducir un aumento en el porcentaje de espermatozoides fosforilados. La co-incubación de espermatozoides con GABA y bicuculina o picrotoxina anuló completamente el efecto previamente observado en el porcentaje de espermatozoides marcados con el anticuerpo antifosfotirosina. Además, ninguna de las drogas tuvo algún efecto *per se*, sugiriendo que esta inhibición obedece a un bloqueo de la acción gabaérgica.

La tercera evidencia de la acción del GABA sobre la capacitación y la concomitante fosforilación en residuos tirosina se obtuvo por incubación con el compuesto alopregnanolona. Para confirmar su efecto, y en función de su efecto particular sobre el GABA, se realizaron incubaciones en presencia de GABA 1  $\mu$ M (es decir, una concentración que no alcanza a ser efectiva) junto a alopregnanolona (Figura 7). Esta baja concentración de GABA no fue efectiva para capacitar espermatozoides ni para

producir un aumento del porcentaje de espermatozoides con marcación antifosfotirosina respecto al control. En cambio, cuando el GABA 1  $\mu$ M se asoció a la alopregnanolona, se observó un claro efecto capacitante, y asociado a esta capacitación, un aumento significativo del porcentaje de espermatozoides reactivos al anticuerpo antifosfotirosina.

La cuarta evidencia de la acción del GABA sobre la capacitación y su posterior manifestación en la fosforilación de proteínas en residuos tirosina se obtuvo por incubación con dehidroepiandrosterona sulfato (DHEAS), (Figura 7). La DHEAS *per se* no indujo fosforilación en proteínas de espermatozoides, pero inhibió parcialmente la acción del GABA 20  $\mu$ M, evidenciada tanto en el patrón de CTC como en el de fosfotirosina.

## Discusión

Los resultados presentados en este trabajo demuestran que el GABA produce un efecto ca-

pacitante sobre los espermatozoides de carnero según lo indica el aumento del porcentaje de espermatozoides con un patrón de unión de CTC compatible con un estado capacitado.<sup>10</sup> El efecto semejante al producido por el GABA que tiene el muscimol (un agonista del receptor GABA<sub>A</sub>), junto con la ausencia de efecto del baclofen (un agonista del receptor GABA<sub>B</sub>), y con la completa abolición del efecto del GABA por el uso de picrotoxina, bicuculina y DHEAS, y la potenciación por alopregnanolona, indican claramente que se encuentra involucrado un receptor GABA<sub>A</sub> clásico en este tipo de efecto. Estos resultados también indican que en el espermatozoide de carnero no está implicado un receptor GABA<sub>B</sub> o al menos una entidad similar al receptor GABA<sub>B</sub> con respecto a su sensibilidad a la bicuculina.

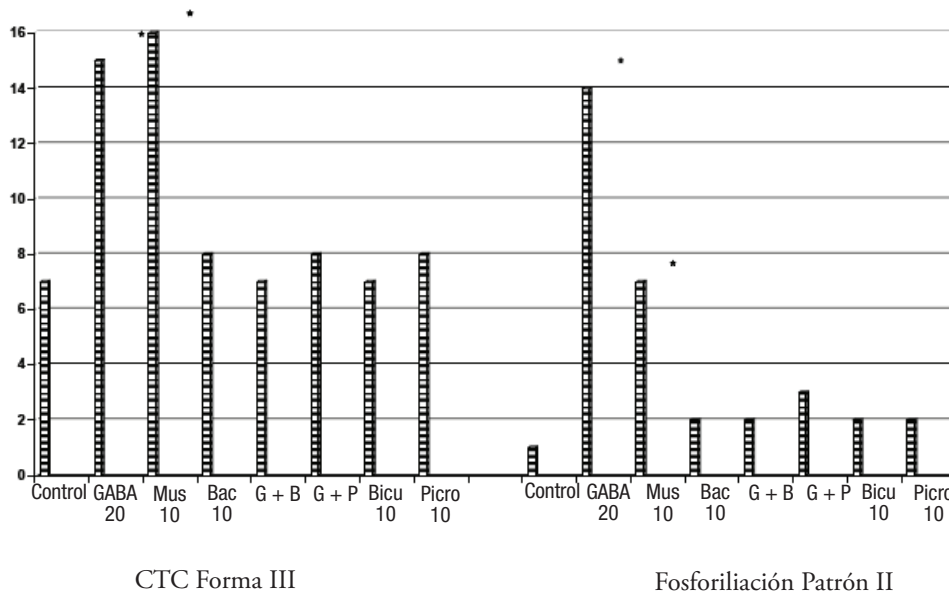
El estudio de un posible papel del GABA en la función espermática se originó a partir de las altas concentraciones de este compuesto, usualmente considerado como un clásico neurotransmisor que actúa a nivel de la hendidura sináptica, encontradas en los tractos reproductivos femenino y masculino en otras especies. Las concentraciones

altas de GABA encontradas en el oviducto indicarían un papel en el proceso de fecundación,<sup>18,19</sup> actuando directamente sobre el oocito, sobre el espermatozoide o sobre ambos. Alternativamente el GABA podría modular la contractilidad oviductal y uterina para facilitar el transporte espermático<sup>20</sup> o podría tener una función inmunomodulatoria.<sup>21,22</sup> No obstante, la presencia de un receptor GABA inmunorreactivo<sup>23-26</sup> y la presencia de un sitio de unión del tipo GABA<sub>A</sub><sup>27</sup> en el espermatozoide sugiere una acción directa a este nivel.

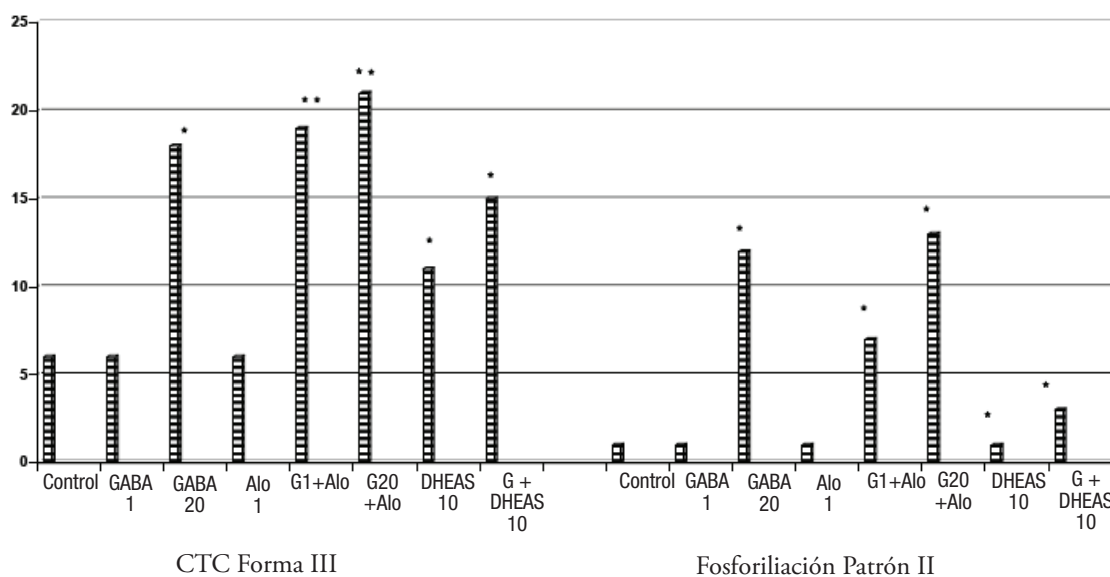
Las concentraciones de GABA que producen un efecto capacitante *in vitro* son compatibles con las concentraciones presentes en el fluido oviductal ovino,<sup>28</sup> lo que apoya una base fisiológica para su acción. Adicionalmente se debe tener en cuenta que *in vivo* el efecto del GABA puede ser aumentado por compuestos que actúan sobre el receptor GABA<sub>A</sub> tales como esteroides neuroactivos o compuestos endógenos con actividad benzodiazepina.

La progesterona y la 17-hidroxiprogesterona han sido identificadas como responsables de la reacción acrosómica inducida por el fluido folicular en humanos.<sup>29</sup>

**Figura 6.** Efecto del muscimol, baclofen, GABA y antagonistas del receptor GABA<sub>A</sub> sobre la capacitación de espermatozoides de carnero determinada por CTC y sobre el porcentaje de espermatozoides con Patrón II de marcación antifosfotirosina. Los espermatozoides fueron incubados en medio BWW-m sólo (Control) o conteniendo 20  $\mu$ M GABA (GABA 20), 10  $\mu$ M muscimol (Mus 10), 10  $\mu$ M baclofen (Bac 10), 10  $\mu$ M bicuculina (Bicu), 10  $\mu$ M picrotoxina (Picro 10) o una combinación de GABA y uno de los antagonistas de GABA.  $n = 5$  eyaculados, \* $p < 0,01$  vs Control.



**Figura 7.** Efecto del GABA, alopregnanolona y DHEAS sobre la capacitación de espermatozoides de carnero determinada por CTC y sobre el porcentaje de espermatozoides con Patrón II de marcación antifosfotirosina. Los espermatozoides fueron incubados en medio BWW-m sólo (Control) o conteniendo GABA 1 ó 20  $\mu$ M, alopregnanolona (Alo) 1  $\mu$ M, dehidroepiandrosterona sulfato (DHEAS) 10  $\mu$ M, o una combinación de ambos como se indica.  $n=5$  eyaculados, \* $p<0,01$ , \*\* $p<0,001$  vs Control para GABA 20, G1 + Alo y G20 + Alo. \* $p<0,01$  vs GABA 20 para DHEAS 10 y G + DHEAS 10.



Se sabe que la progesterona actúa a nivel de la membrana plasmática de los espermatozoides,<sup>30, 31</sup> pero en nuestro modelo no aceleró la capacitación, aún en presencia de GABA (datos no mostrados), mientras que la alopregnanolona claramente desarrolla un efecto potenciador.

Se ha sugerido que parecería no haber relación directa entre la capacidad de ciertos progestágenos para potenciar la acción del GABA sobre un receptor del tipo GABA<sub>A</sub> y su capacidad para inducir la reacción acrosómica en espermatozoides humanos.<sup>27</sup> Teniendo esto en cuenta, y considerando que también podría haber diferencias entre especies, los resultados aquí presentados nos llevan a proponer la hipótesis de que podrían coexistir un clásico receptor GABA<sub>A</sub> con un receptor GABA distinto que presenta propiedades farmacológicas únicas, y que ambos podrían cumplir funciones diferentes en distintas etapas de la fecundación. Por otra parte, está bien documentado que la combinación de diferentes formas de subunidades del receptor GABA<sub>A</sub> determina la sensibilidad del

complejo supramolecular a los diferentes agonistas y antagonistas.<sup>38-40</sup> Por lo tanto, recientes descubrimientos de la acción del GABA a nivel del espermatozoide requieren estudios más detallados sobre la caracterización molecular y las propiedades farmacológicas del receptor involucrado en la regulación de la función espermática.

Los experimentos llevados a cabo en este trabajo nos indican que el porcentaje de espermatozoides que alcanza la Forma III de CTC por la acción del GABA nunca excede el 20%, sugiriendo que sólo una pequeña subpoblación de los espermatozoides en una muestra de semen es capaz de responder al GABA. Comparativamente cerca del 70% de los espermatozoides de los mismos carneros, obtenidos en la misma época, exhibieron un Patrón III de CTC después de la incubación con fluido oviductal sintético conteniendo suero.<sup>10</sup> La baja respuesta al GABA es apoyada por Wistrom y Meizel,<sup>26</sup> quienes demostraron que en el semen humano sólo una subpoblación (aproximadamente la mitad) de los espermatozoides fueron posi-

tivos a la marcación inmunofluorescente con un anticuerpo monoclonal contra la subunidad del receptor GABA<sub>A</sub>. No obstante, existe la posibilidad de que *in vivo* moduladores endógenos de la acción del GABA a nivel del receptor GABA<sub>A</sub> (tales como benzodiazepinas endógenas o metabolitos de la progesterona) podrían contribuir a aumentar la eficacia del GABA en la capacitación de los espermatozoides. En contraposición a estos resultados, Zhang y col,<sup>41</sup> utilizando 5 M de GABA en espermatozoides humanos, obtuvieron capacitación de un 65,9 % de los espermatozoides luego de 2 horas de capacitación (37,3 % en el control) según CTC.

La fosforilación de proteínas estructurales y reguladoras es el mecanismo de control intracelular más importante en eucariotas.<sup>42, 43</sup> El estudio de la fosforilación en tirosina de proteínas del espermatozoide es de gran interés, ya que ha sido sugerido como un indicador de cambios intracelulares que preceden y/o están asociados con la capacitación en diversas especies de mamíferos.<sup>3, 4, 44-46</sup> Se ha postulado que las proteínas fosforiladas en tirosina iniciarían la unión (*binding*) a la zona pelúcida<sup>47-49</sup> y que inducirían la reacción acrosómica.<sup>9, 50</sup>

En nuestro caso la incubación de espermatozoides de carnero en presencia de GABA 20 M indujo la fosforilación de proteínas en residuos tirosina en la región acrosomal de una subpoblación de la muestra. Dada la presencia en espermatozoides no capacitados de fosfotirosina en el segmento ecuatorial y el flagelo de espermatozoides no capacitados, no fue posible evaluar los cambios en dichas regiones por la técnica utilizada en la forma en que fue descrita por diversos autores.<sup>55, 56, 60, 61</sup> No obstante ello, la aparición de marca en la región acrosomal en condiciones capacitantes sugiere que la fosforilación de la región acrosomal podría utilizarse como un marcador sensible de la capacitación.

En conclusión, el conjunto de los resultados presentados en este trabajo indica que el GABA ejerce un efecto capacitante *in vitro* sobre los espermatozoides de carnero, evaluado por el aumento del porcentaje de espermatozoides con un patrón de unión de CTC compatible con un estado capacitado y modifica el patrón de fosforilación en residuos tirosina. Ambos efectos del GABA estarían mediados por su interacción con un receptor GABA<sub>A</sub> clásico.

## Referencias

1. Tesarik J, Moos J, Mendoza C. Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by a progesterone receptor on the cell surface of human sperm. *Endocrinology* 1993; 133: 328-335.
2. Burks DJ, Carballada R, Moore HDM, et al. Interaction of a tyrosine kinase from human sperm with the zona pellucida at fertilization. *Science* 1995; 269: 83-86.
3. Visconti PE, Moore GD, Bailey JL, et al. Capacitation of mouse spermatozoa II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by cAMP-dependent way. *Development* 1995a; 121: 1139-1150.
4. Visconti PE, Bailey JL, Moore GD, et al. Capacitation of mouse spermatozoa I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* 1995; 121(4): 1129-1137.
5. Tomes CN, Mc Master CR, Sailing PM. Activation of mouse PIP2-PLC by zona pellucida is modulated by tyrosine phosphorylation. *Mol Reprod Dev* 1996; 43(2): 196-204.
6. Tomes CN, Carballada R, Moses DF, et al. Treatment of human spermatozoa with seminal plasma inhibits protein tyrosine phosphorylation. *Mol Hum Reprod* 1998; 4(1): 17-25.
7. Brewis IA, Clayton R, Browes CE, et al. Tyrosine phosphorylation of a 95 kDa protein and induction of the acrosome reaction in human spermatozoa by recombinant human zona pellucida glycoprotein 3. *Mol Hum Rep* 1998; 4(12): 1136-1144.
8. Flesch FM, Colenbrander B, van Golde LMG, et al. Capacitation induces tyrosine phosphorylation of proteins in the boar sperm plasma membrane. *Biochem Biophys Res Comm* 1999; 262(3): 787-792.
9. Naz RK. Protein tyrosine phosphorylation and signal transduction during capacitation/acrosome reaction and zona pellucida binding in human sperm. *Arch Androl* 1996; 37(1): 47-55.
10. Perez LJ, Valcarcel A, de las Heras MA, et al. In vitro capacitation and induction of acrosomal exocytosis in ram spermatozoa as assessed by the chlortetracycline assay. *Theriogenology* 1996; 45(5): 1037-1046.
11. Biggers JD, Whitten WK, Whittingham DC. The culture of mouse embryos in vitro. In: Daniel JC, ed. *Methods in Mammalian Embryology*. San Francisco: WH Freeman & Co; 1971. p.93-113.
12. Moses D, de las Heras MA, Valcarcel A, et al. Use of computerized motility analyzer for the evaluation of frozen-thawed ram spermatozoa. *Andrologia* 1995; 27(1): 25-29.
13. Valcarcel A, de las Heras MA, Perez L, et al. Fluorescent staining as a method of assessing membrane damage and post-thaw survival of ram spermatozoa. *Theriogenology* 1994; 41: 483-489.
14. Watson PF, Jones PS, Plummer JM. A quantitative comparison of the spontaneous and ionophore-induced acrosome reaction in ejaculated ram spermatozoa: the effects of temperature, time and individual. *Anim Reprod Sci* 1991; 24: 93-108.

15. Valcarcel A, de las Heras MA, Perez L, et al. Assessment of the acrosomal status of membrane-intact ram spermatozoa after freezing and thawing, by simultaneous lectin/Hoechst 33258 staining. *Anim Reprod Sci* 1997;45(4): 299-309.
16. Cross NL, Morales P, Overstreet JW, et al. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Gamete Res* 1986; 15: 213-226.
17. Steel RGD, Torrie JH. Principles and Procedures of Statistics A Biomedical Approach. Mc Graw-Hill, NY, 1981.
18. Erdö SL, Rosdy B, Szporny L. Higher GABA concentrations in fallopian tube than in brain of the rat. *J Neurochem* 1982; 38(4): 1174-1176.
19. Tanaka C. Aminobutyric acid in peripheral tissues. *Life Sci* 1985; 37(24): 2221-2235.
20. Erdö SL, Kiss B, Szporny L. Comparative characterization of glutamate decarboxylase in crude homogenates of oviduct, ovary and hypothalamus. *J Neurochem* 1984; 43(6):1532-1537.
21. Petit JM, Mc Intyre TD, Mc Rae BL, et al. Differential immune responsiveness in mouse lines selectively bred for high and low sensitivity to ethanol. *Brain Behav Immun* 1990; 4(1): 39-49.
22. Scatton B, Benavides J, Dubois A, et al. Proliferation of omega 3 binding sites in the immune organs and leg infiltrate of rats with adjuvant induced arthritis. *Int J Tissue React* 1990;12(1): 15-20.
23. Hu JH, He XB, Wu Q, et al. Subunit composition and function of GABA<sub>A</sub> receptors of rat spermatozoa. *Neurochem Res* 2002a; 27(3): 195-199.
24. Hu JH, He XB, Wu Q, et al. Biphasic effect of GABA on rat sperm acrosome reaction: involvement of GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors. *Arch Androl* 2002b; 48(5):369-378.
25. Ritta MN, Bas DE, Tartagliones CM. In vitro effect of gamma-aminobutyric acid on bovine spermatozoa capacitation. *Mol Reprod Dev* 2004; 67(4): 478-486.
26. Wistrom CA, Meizel S. Involvement of a human sperm putative GABA<sub>A</sub> receptor/Cl<sup>-</sup> channel complex in the progesterone-initiated acrosome reaction. *Dev Biol* 1993; 159: 679-690.
27. Erdö SL, Wekerle L. GABA<sub>A</sub>-type binding sites on membranes of spermatozoa. *Life Sci* 1990; 47: 1147-1151.
28. Moses DF, Valcarcel A, Rosenstein RE, et al. Evidence for a role of oviductal gamma-aminobutyric acid (GABA) in ram sperm capacitation. *Theriogenology* 1999;51: 317.
29. Osman RA, Andria ML, Jones AD, et al. Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;160(2): 828-833.
30. Mendoza C, Soler A, Tesarik J. Nongenomic steroid action-independent targeting of a plasma membrane calcium channel and a tyrosine kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 210(2): 518-523.
31. Sabeur K, Edwards DP, Meizel S. Human sperm plasma membrane progesterone receptor(s) and the acrosome reaction. *Biol Reprod* 1996; 54(5): 993-1001.
32. Blackmore PF, Im WB, Bleasdale JE. The cell surface progesterone receptor which stimulates calcium influx in human sperm is unlike the A ring reduced steroid site on the GABA<sub>A</sub> receptor/chloride channel. *Mol Cell Endocrinol* 1994;104(2):237-243.
33. Turner K, García MA, Meizel S. Progesterone initiation of the human sperm acrosome reaction: the obligatory increase in intracellular calcium is independent of the chloride requirement. *Mol Cell Endocrinol* 1994;101(1-2): 221-225.
34. Kholkute SK, Rodriguez J, Dukelow WR. In vitro fertilization and the effect of progesterone and 17-hydroxyprogesterone on acrosome reaction of the mouse epididymal spermatozoa. *Int J Androl* 1995; 18(3):146-150.
35. Shi QX, Roldán ERS. Evidence that a GABA<sub>A</sub>-like receptor is involved in progesterone-induced acrosomal exocytosis in mouse spermatozoa. *Biol Reprod* 1995; 52(2):373-381.
36. Somanath PR, Gandhi KK. Expression of membrane associated non-genomic progesterone receptor(s) in caprine spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2002;74(3-4):195-205.
37. Somanath PR, Suraj K, Gandhi KK. Caprine sperm acrosome reaction: promotion by progesterone and homologous zona pellucida. *Small Rumin Res* 2000;37(3): 279-286.
38. Mehta AK, Ticku MK. An update on GABA<sub>A</sub> receptors. *Brain Res Rev* 1999;29:196-217.
39. Mihic SJ, Sanna E, Whiting PJ, et al. Pharmacology of recombinant GABA<sub>A</sub> receptors. In: Biggio G, Costa E, eds GABA<sub>A</sub> receptors and anxiety: from neurobiology to treatment. New York. Raven Press;1995.p.17-40
40. Smith AJ, Alder L, Silk J, et al. Effect of alpha subunit on allosteric modulation of ion channel function in stably expressed human recombinant gamma-aminobutyric acid(A) receptors determined using (36)Cl ion flux. *Mol Pharmacol* 2001;59:1108-1118.
41. Zhang H, Ni J, Zhang W, et al. GABA inhibits progesterone production of luteal cells of rat ovary. *Sheng Li Xue Bao* 2000;52:185-187.
42. Johnson LN, Barford D. The effects of phosphorylation on the structure and function of proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1993;22:199-232.
43. Pawson T. Protein modulates and signalling network. *Nature* 1995;373:573-580.
44. Galantino-Homer HL, Visconti PE, Kopf GS. Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by cyclic adenosine 3'5'-monophosphate-dependent pathway. *Biol Reprod* 1997;56:707-719.
45. Kalab P, Peknicova J, Geussova G, et al. Regulation of protein tyrosine phosphorylation in boar sperm through a cAMP-dependent pathway. *Mol Reprod Dev* 1998;51: 304-314.
46. Osheroff JE, Visconti PE, Valenzuela JP, et al. Regulation of human sperm capacitation by a cholesterol efflux-stimulated signal transduction pathway leading to protein kinase A-mediated up-regulation of protein tyrosine phosphorylation. *Mol Hum Reprod* 1999;5:1017-1026.

47. Asquith KL, Baleato RM, McLaughlin EA, et al. Tyrosine phosphorylation activates surface chaperones facilitating sperm-zona recognition. *J Cell Sci* 2004;117:3645-3657.
48. Liu DY, Clarke GN, Baker HW. Tyrosine phosphorylation on capacitated human sperm tail detected by immunofluorescence correlates strongly with sperm-zona pellucida (ZP) binding but not with the ZP-induced acrosome reaction. *Hum Reprod* 2006;21:1002-1008.
49. Sakkas D, Leppens-Luisier G, Lucas H, et al. Localization of tyrosine phosphorylated proteins in human sperm and relation to capacitation and zona pellucida binding. *Biol Reprod* 2003; 68:1463-1469.
50. Pukazhenti BS, Wildt DE, Ottinger MA, et al. Inhibition of domestic cat spermatozoa acrosome reaction and zona pellucida penetration by tyrosine kinase inhibitors. *Mol Reprod Dev* 1998;49:48-57.
51. Leyton L, Saling P. 95 kd sperm proteins binds ZP3 and serve as tyrosine kinase substrates in response to zona binding. *Cell* 1989; 57:1123-1130.
52. Duncan AE, Fraser LR. Cyclic AMP dependent phosphorylation of epididymal mouse sperm proteins during capacitation *in vitro*: identification of an Mr 95000 phosphotyrosine-containing protein. *J Reprod Fertil* 1993;97: 287-299.
53. Emiliozzi C, Fenichel P. Protein tyrosine phosphorylation is associated with capacitation of human sperm *in vitro* but is not sufficient for its completion. *Biol Reprod* 1997;56:674-679.
54. Visconti PE, Kopf GS. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol Reprod* 1998;59:1-6.
55. Dube C, Tardif S, LeClerc P, et al. The importance of calcium in the appearance of p32, a boar sperm tyrosine phosphoprotein, during *in vitro* capacitation. *J Androl* 2003; 24:727-733.
56. Tardif S, Dube C, Bailey JL. Porcine sperm capacitation and tyrosine kinase activity are dependent on bicarbonate and calcium but protein tyrosine phosphorylation is only associated with calcium. *Biol Reprod* 2003; 68: 207-213.
57. Visconti PE, Ning X, Fornes MW, et al. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Dev Biol* 1999; 214:429-443.
58. Hess KC, Jones BH, Marquez B, et al. The "soluble" adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization. *Dev Cell* 2005;9:249-259.
59. Pommer AC, Rutlant J, Meyers, SA. Phosphorylation of protein tyrosine residues in fresh and cryopreserved stallion spermatozoa under capacitating conditions. *Biol Reprod* 2003;68:1208-1214.
60. Kaneto M, Harayama H, Miyake M, et al. Capacitation-like alterations in cooled boar spermatozoa: assessment by the chlortetracycline staining assay and immunodetection of tyrosine-phosphorylated sperm proteins. *Anim Reprod Sci* 2002;73:197-209.
61. Perez Pe R, Marti JI, Tejedor A, et al. Sperm-lectin agglutination combined with swim-up leads to an efficient selection of highly motile, viable and heterogeneous ram spermatozoa. *Theriogenology* 2002;51:623-636.