

## CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LA FISILOGIA DEL EPIDIDIMO HUMANO Y SU PARTICIPACION EN EL PROCESO DE MADURACION DE LOS ESPERMATOZOIDES

Dr. Blaquier, J. A. - Dr. Cameo, M. S. - Dr. de Larminat, M. A. - Dr. Scorticati, C.\* - Dr. Tezón, J. G.  
Dr. Vázquez, M. H.

### Resumen y conclusiones

*Nuestro trabajo ha permitido desarrollar un modelo experimental, los túbulos epididimarios humanos mantenidos en cultivo de órgano.*

*Este modelo es útil para estudiar la fisiología de este tejido, pues se comporta de manera similar al órgano in situ de animales de experimentación.*

*Su respuesta a la estimulación androgénica es cualitativamente similar a la del epididimo de la rata. La testosterona es metabolizada a DHT en el tejido y ésta es unida por un receptor específico. El número de estos receptores es influenciado por los andrógenos, al igual que en la rata, y este mecanismo de control continúa funcionando en el tejido en cultivo.*

*Resultados obtenidos en diversas especies permiten confirmar la participación de proteínas andrógeno-dependientes, secretadas por el epitelio epididimario, en el proceso de maduración de una subpoblación fertilizante de los espermatozoides.*

*La evidencia experimental sugiere que dichas proteínas se unen a la superficie de los espermatozoides, durante su tránsito por el epididimo, contribuyendo a formar un sitio de reconocimiento específico para la zona pelúcida de los ovocitos de su misma especie.*

*El modelo experimental desarrollado permitió investigar la existencia de un fenómeno similar en el epididimo humano.*

*Se identificaron 5 bandas de proteínas cuya síntesis es consistentemente estimulada por los andrógenos en los cultivos de epididimo humano. Tres de estas proteínas también se unen a los espermatozoides. Utilizando a éstas como antígeno se produjo un antisuero que reconoce específicamente a las células del epididimo y a los espermatozoides que han transitado por este órgano.*

*El antisuero ha sido utilizado para estudiar el posible papel biológico de las proteínas. Al comparar espermatozoides de donantes fértiles y pacientes estériles se comprobó la existencia de una subpoblación de éstos que contenían una menor cantidad de antígenos sobre su superficie y cuya localización era anormal, sugiriendo una relación entre estos hallazgos y la infertilidad que presentaban.*

*En otro estudio se siguió el comportamiento de los antígenos durante el periodo de capacitación in vitro, necesario para obtener fertilización in vitro, y los resultados sugieren la existencia de una correlación entre la velocidad a que se pierden los antígenos de la superficie de los espermatozoides y su capacidad fertilizante.*

*Consideramos que los resultados expuestos demuestran la utilidad potencial del modelo experimental desarrollado.*

### Introducción

Durante largo tiempo subsistió el concepto que el epididimo en los mamíferos servía fundamentalmente como un conducto para transferir los espermatozoides desde el testículo hasta las vías eyaculadoras.

Esta idea sufrió un cambio radical con los estudios de Young, a principio de la década del 30, quien demostró por primera vez en el cobayo que la inseminación de espermatozoides recuperados del testículo no producía fertilización en la hembra y que la capacidad de fertilizar era adquirida durante el tránsito por el epididimo.<sup>1</sup>

A esta comprobación inicial siguieron unos treinta años durante los cuales no hubo adelantos de importancia en el tema hasta que, hacia fines de la década del 60, renació el interés por el estudio de la fisiología de la reproducción en el hombre y otros mamíferos. A partir de allí se comienza a estudiar el proceso de maduración de los espermatozoides, que definimos como la serie de cambios que ocurren durante el tránsito por el epididimo y que resultan en la adquisición de capacidad fertilizante.

Los cambios más obvios que sufre el espermatozoide de todo mamífero durante los 10-15 días que transcurre en el epididimo son: el adquirir la capacidad de fertilizar los ovocitos homólogos y la aparición de la motilidad translativa.

En una primera instancia se creyó que el epididimo proveía al espermatozoide de un medio adecuado para que desarrollara su maduración, que era una potencialidad intrínseca de la célula. Esta teoría fue refutada cuando, por medio de ligaduras, se pudo retener espermatozoides por largos periodos dentro de segmentos seleccionados del epididimo. Con estos experimentos se pudo comprobar que si bien era posible obtener desarrollo de la motilidad progresiva, nunca se conseguía incrementar la capacidad fertilizante.<sup>2</sup>

Estos resultados muestran claramente la disociación que existe entre el fenómeno de adquisición de motilidad y la potencial capacidad fertilizante. Si bien la primera es condición necesaria para la fertilización fisiológica, no es el único parámetro que define la fertilidad de un semen, un error muy arraigado dentro de la práctica andrológica.

Con estas observaciones se puso de manifiesto el papel activo del epididimo en el proceso de maduración y surgió la inquietud por estudiar los mecanismos por los cuales se modificaba la funcionalidad del espermatozoide, la identificación de los intermediarios de esta acción y los sistemas de control del proceso. Nuestro grupo de trabajo ha mantenido una activa participación en este campo, estudiando la naturaleza de los intermediarios que produce el epididimo y actúan sobre los espermatozoides en la rata y el hámster. Sin embargo, el terreno en el cual nuestra contribución es única es en el estudio de la fisiología del epididimo humano y del proceso de maduración, ya que constituimos el único grupo que ha publicado sistemáticamente sobre el tema durante los últimos 8 años.

El propósito de este trabajo es efectuar una recopilación de los resultados más trascendentes de nuestras publicaciones.

### Existencia del proceso de maduración de espermatozoides en el hombre

Una búsqueda de la literatura, efectuada en 1978, permitió establecer que no existía una demostración clara de la existencia de un fenómeno de maduración de los espermatozoides, similar al de los demás mamíferos, en el hombre. Los trabajos existentes se referían a los cambios en la motilidad de los espermatozoides recuperados de distintos segmentos del epididimo.<sup>3,4</sup>

Recién con la aparición del ensayo de penetración de ovocitos de hámster sin zona pelúcida<sup>5</sup> en 1976 se contó con una prueba funcional que permitía estimar la capacidad fertilizante de los espermatozoides humanos.

Instituto de Biología y Medicina Experimental, Obligado 2490, Buenos Aires.

\* Instituto de Oncología "Angel Roffo", Universidad de Buenos Aires.

En 1980 fuimos los primeros en demostrar que los espermatozoides recuperados de la *caput* del epidídimo, es decir los más inmaduros, eran incapaces de penetrar ovocitos de hámster, al igual que los recuperados del *corpus* epididimario. En contraste, los espermatozoides obtenidos del *cauda* del epidídimo penetraron 27 % de los ovocitos<sup>(6)</sup> (fig. 1). Pudimos comprobar también que la capacidad de los espermatozoides para unirse a la membrana vitelina de los ovocitos crecía a medida que los espermatozoides transitaban por los sucesivos segmentos epididimarios.

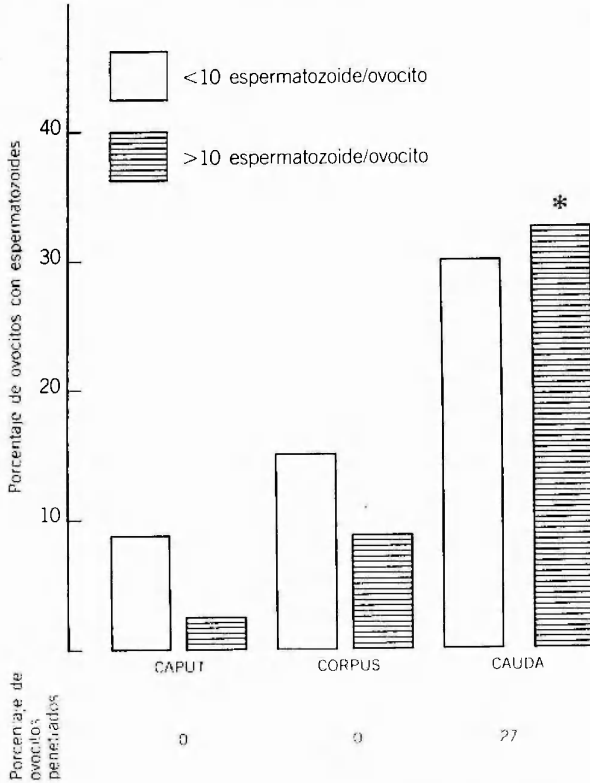


Figura 1. Unión y penetración de ovocitos de hámster libres de zona pelúcida, por espermatozoides humanos. (Hinrichsen y col., 1980<sup>(6)</sup>).

Estos resultados fueron interpretados como la demostración de la existencia de un cambio funcional en los espermatozoides durante el tránsito epididimario. Este les permitía completar el proceso de capacitación, que ocurre en el tracto genital femenino, requerido para producir una membrana con características fusogénicas, necesaria para penetrar el ovocito.

Nuestros resultados fueron confirmados y ampliados por Moore, Hartman y Pryor en 1983, quienes encontraron que espermatozoides del *caput* del epidídimo eran incapaces de penetrar ovocitos de hámster mientras que los recuperados del *corpus* y *cauda* del epidídimo penetraban 15 % y 43 %, respectivamente.

Con esta confirmación quedó establecido que los espermatozoides humanos comienzan a desarrollar la potencialidad para penetrar ovocitos al pasar por el *corpus* del epidídimo y que esta capacidad es máxima cuando las células alcanzan el segmento caudal del órgano. Más aún, la comparación de los valores de penetración obtenidos en los dos trabajos mencionados y aquellos que resultaban del ensayo de espermatozoides eyaculados,<sup>(7)</sup> permitió establecer que los espermatozoides adquieren la totalidad de su capacidad fertilizante en el *cauda* del epidídimo y que ésta no aumenta luego de la eyacuación.

### Desarrollo de un modelo experimental para el estudio de la fisiología del epidídimo humano

Habiéndose comprobado la existencia del proceso de maduración de la capacidad fertilizante de los espermatozoides en el

epidídimo humano, surgió la inquietud de estudiar sus mecanismos fisiológicos y de control.

Clásicamente, los estudios en animales habían tomado como hecho fundamental la total dependencia de ese proceso en la provisión normal de andrógenos al epidídimo. Por consiguiente, la estrategia de estudio se basó en la identificación de los componentes que disminuían luego de la castración y que eran reinducidos por la administración de andrógenos.

De esta manera se aislaron y caracterizaron componentes de la secreción epididimaria que se unían a los espermatozoides de varias especies animales, principalmente glicoproteínas, que tenían intervención directa en el desarrollo de la capacidad fertilizante.<sup>(8)</sup>

A fin de poder aplicar esta estrategia tan exitosa al estudio del epidídimo humano decidimos encarar el desarrollo de un modelo experimental que nos permitiera estudiar la influencia de los andrógenos sobre el tejido e identificar los productos de éste que tuviesen relación con la maduración de los espermatozoides.

Basados en nuestra experiencia anterior con epidídimo de rata,<sup>(10)</sup> adaptamos un sistema de cultivo de órgano para el epidídimo humano. Luego de una serie de pruebas conseguimos definir las condiciones en las cuales podíamos mantener los tejidos vivos y en buen estado por períodos de 8-10 días y obtener respuesta al agregado de andrógenos *in vitro*.<sup>(11)</sup> La condición esencial para lograr estimulación fue someter al tejido a una etapa de depleción de los andrógenos endógenos, cosa que se logró manteniendo los cultivos durante tres días en un medio rico en proteína (agregado de suero fetal bovino), pero libre de esteroides endógenos.

Como primera aproximación a la caracterización de este modelo experimental estudiamos su respuesta a la estimulación con diferentes concentraciones de andrógenos dentro del rango  $10^{-6}$  molar a  $10^{-9}$  molar. Utilizando la incorporación de aminoácidos y timidina radiactivos a proteína y ADN, respectivamente, como puntos de referencia, encontramos un efecto máximo de testosterona y dihidrotestosterona (DHT) cuando los esteroides se agregaban a una concentración  $1 \times 10^{-7}$  molar, produciendo una estimulación de la incorporación que superaba 200 % (figura 2). En estos mismos experimentos se observaba que la presencia de andrógenos en el medio duplicaba la altura del epitelio pseudoestratificado que tapiza la luz de los tubulos.<sup>(11)</sup>

Cabe destacar que este efecto de máxima estimulación se obtuvo con la concentración de andrógenos más similar a la que fisiológicamente se encuentra en el tejido epididimario. La concentración endógena de andrógenos se deduce de la determinación de testosterona y DHT (46 y 13 ng/g de tejido)<sup>(12)</sup> y de un contenido de agua de 80 % y resulta ser de  $2 \times 10^{-7}$  molar para ambos andrógenos combinados.

Los pasos siguientes en la caracterización del modelo experimental fueron dirigidos al estudio del mecanismo por el cual los andrógenos ejercen su acción sobre el tejido mantenido en cultivo.

Investigaciones llevadas a cabo en el epidídimo de la rata *in vivo* habían confirmado la existencia de una activa conversión de testosterona, la hormona producida por el testículo, en DHT, la hormona activa a nivel celular. Por consiguiente se encaró el estudio de la existencia de esta conversión en el epidídimo humano en cultivo, la caracterización de la enzima 5 $\alpha$ -reductasa que cataliza la reacción y la investigación de los mecanismos de control de la actividad enzimática.

También es sabido que la DHT formada *in situ* se une a un receptor específico y que es este complejo el capaz de actuar sobre el ADN nuclear a fin de estimular la transcripción de los segmentos genómicos involucrados en la codificación de las proteínas que confieren las características andrógeno-dependientes propias del tejido.

Por consiguiente, se decidió investigar la presencia de receptores específicos para andrógenos en el tejido en cultivo, su significación fisiológica (proporción de hormona unida a receptor y libre) y los mecanismos regulatorios del número de receptores por célula.

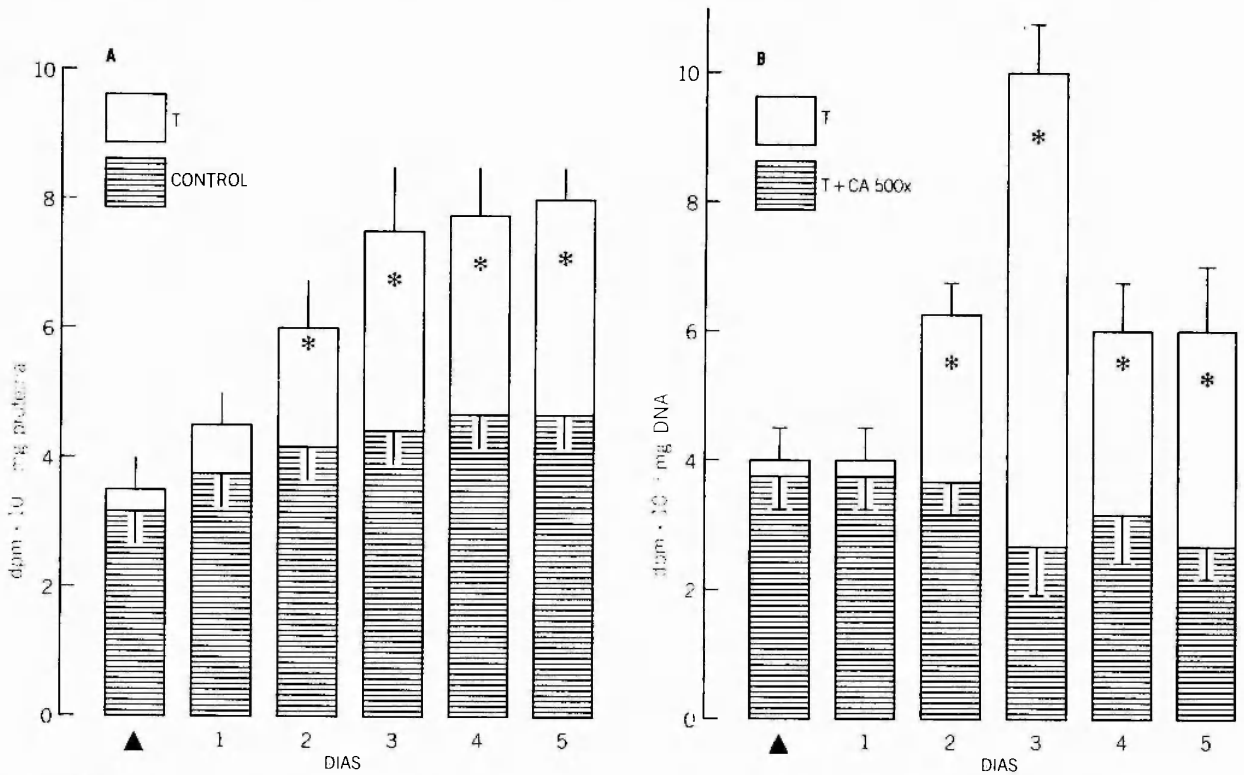


Figura 2. Efecto de andrógenos en la incorporación de aminoácidos y timidina en túbulos epididimarios humanos en cultivo [Tezón y col., 1981<sup>[11]</sup>].  
 Panel A: incorporación de aminoácidos tritados.  
 T: testosterona  $10^{-7}$  molar.  
 Control: vehículo.  
 Panel B: incorporación de timidina tritada.  
 T: testosterona  $10^{-7}$  molar.  
 T+CA: testosterona  $10^{-7}$  molar más acetato de ciprotterona  $5 \times 10^{-5}$  molar.

Un resumen de los primeros estudios indica que el tejido en cultivo tomó ávidamente el andrógeno agregado al medio de cultivo de tal manera que, ante una concentración ofrecida de 24 nM 3H-testosterona, a los 15 minutos de cultivo se encontraban 33 fmoles/mg proteína dentro del tejido y esta captación crecía rápidamente para llegar a 100 fmoles/mg proteína a las 3 horas y a un máximo de 146 fmoles/mg proteína a las 6 hs.<sup>[13]</sup>

Por su parte, la hormona contenida en el tejido fue rápidamente convertida a 3H-DHT, que representaba más de 65% a partir de las 3 horas de cultivo. Los resultados indicaron que la mayor parte de las hormonas radiactivas que se hallaban en el compartimiento citoplasmático de las células se encontraban libres mientras que dentro del compartimiento nuclear 48% de la radiactividad estaba unida a macromoléculas. En este complejo, presumiblemente formado por receptor y hormona, 82% de la radiactividad estaba formada por 3H-DHT<sup>[13]</sup> (figura 3).

La presencia de hormona unida a macromoléculas dentro de las células estimuló la búsqueda de un receptor para andrógenos. Nuestros experimentos permitieron demostrar la presencia y caracterizar un receptor citoplasmático con un cociente de sedimentación 8S, con alta afinidad por DHT y, dentro del compartimiento nuclear, a un receptor con coeficiente de sedimentación 4S, una constante de disociación para DHT de  $1,5 \times 10^{-10}$  molar y un número de sitios de 310 fmoles/mg ADN<sup>[13]</sup> (figura 4). Los experimentos referentes a la conversión de testosterona en sus metabolitos  $5\alpha$ -reducidos, biológicamente activos, fueron luego extendidos utilizando la técnica de superfusión del tejido desarrollada por Gurpide,<sup>[15]</sup> en colaboración con quien se efectuaron los estudios. Se considera que esta técnica representa una condición más cercana a la fisiológica, puesto que aporta el sustrato de manera constante y permite la remoción permanente de los metabolitos que no se acumulan en el tejido o medio.

Luego de alcanzado el estado estacionario, en el cual la entrada de sustrato y salida de metabolitos se han equilibrado, se determinó una actividad  $5\alpha$ -reductasa de 130 pmoles-g de tejido/hora y una marcada retención de DHT, en preferencia a la testosterona u otros metabolitos presentes.<sup>[16]</sup> Estos resultados fueron comparados con los obtenidos a partir de epididimos provenientes de pacientes tratados con dietilestilbestrol, como terapia del carcinoma de próstata.

Encontramos que este tratamiento disminuía significativamente la actividad de la enzima  $5\alpha$ -reductasa a sólo 26 pmoles/g tejido/hora y reducía la retención de DHT por el tejido a  $1/3$  de valor normal,<sup>[16]</sup> aportando de esta manera una base fisiopatológica al tratamiento estrogénico comúnmente usado.

Basados en experimentos anteriores que demostraban la regulación del número de receptores para andrógenos y de la actividad de la  $5\alpha$ -reductasa por los andrógenos en el epidídimo de la rata,<sup>[17, 18]</sup> decidimos explorar la existencia de mecanismo similares y funcionales en el tejido humano mantenido en cultivo.

Luego de poner a punto las técnicas necesarias para la determinación de receptores en las pequeñas muestras que se obtiene de los cultivos,<sup>[19]</sup> pudimos comprobar que al cabo de un período de 6 días de cultivo, los tejidos expuestos a andrógeno (testosterona o DHT  $1 \times 10^{-7}$  molar) contenían 5 veces más receptor que sus controles no tratados. Estos resultados se interpretan como indicando la conservación en el tejido cultivado de un mecanismo regulador de la síntesis de receptor que es andrógeno-dependiente.<sup>[20]</sup>

Aun cuando lo hemos intentado utilizando variadas técnicas, hemos logrado obtener un resultado igualmente claro en referente al control de la actividad  $5\alpha$ -reductasa por andrógenos en el tejido cultivado.

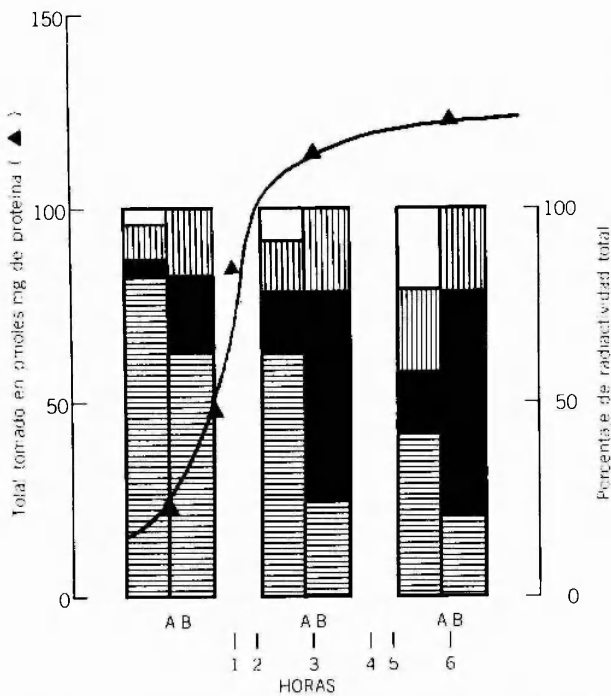


Figura 3. Captación y metabolismo de testosterona tritiada en túbulos de epidídimo humano. [Tezón y col., 1982<sup>(11)</sup>.] Túbulos de epidídimo humano se ponen en cultivo como se describe en el texto. En el punto 0 se agregan 24 nM 1,2,6,7-testosterona tritiada. La captación se mide en pmoles de esteroide tritiado por mg de proteína en el homogenado (—▲—). Alícuotas de medio (A) y homogenado (B) se analizan por TLC para determinar el metabolismo de la testosterona tritiada agregada.

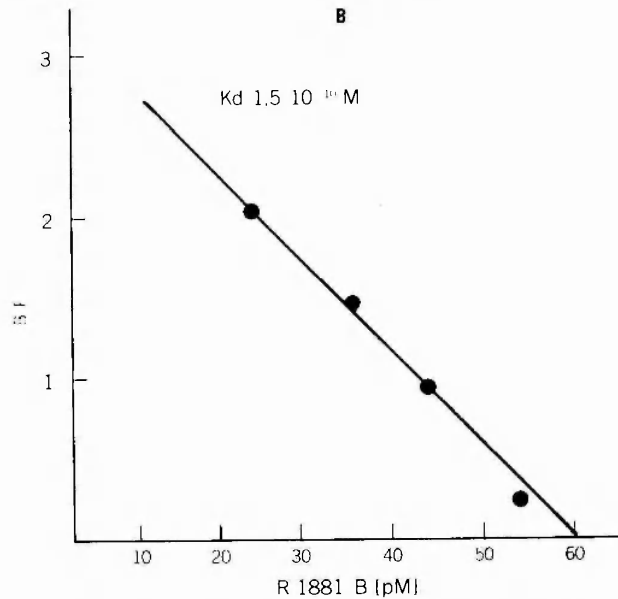


Figura 4. Determinación de sitios totales de unión en núcleos aislados de células epididimarias humanas. [Tezón y col., 1982<sup>(11)</sup>.]

Tomados en conjunto, los resultados presentados nos permiten afirmar que el tejido epididimario humano mantenido en cultivo se comporta en forma muy similar a la del mismo órgano mantenido *in vivo* en la rata. Esta comparación resulta necesaria debido a la casi total ignorancia que existe sobre la fisiología del epidídimo humano. Creemos que este sistema modelo puede contribuir de manera importante a estos estudios. La primera de esas utilizaciones se describe a continuación.

### Utilización del sistema modelo para el estudio de la maduración de los espermatozoides en el epidídimo humano

Estudios origináes realizados en animales de experimentación, y luego extendidos a una serie de animales domésticos, han permitido caracterizar la interacción entre los componentes de la secreción epididimaria y los espermatozoides en proceso de maduración, con el fin primordial de averiguar cuál es el mediador de la adquisición de capacidad fertilizante.

Al cabo de casi dos décadas de investigación en el área, se ha llegado a la conclusión que los factores más claramente involucrados en este proceso son las glicoproteínas andrógeno-dependientes secretadas por el epidídimo y que se incorporan a la superficie de los espermatozoides.

La evidencia experimental que respalda esta afirmación proviene de estudios realizados en la rata en los que el tratamiento de espermatozoides inmaduros con proteínas secretorias epididimarias aumentó el grado de unión de las células a la zona pelúcida homóloga.<sup>(21)</sup> Estos resultados fueron reproducidos por nuestro grupo en el hámster, pudiendo comprobar que las proteínas epididimarias no sólo incrementaban el reconocimiento de la zona pelúcida por los espermatozoides inmaduros,<sup>(22)</sup> sino que también aumentan su capacidad para fertilizar los ovocitos *in vivo* e *in vitro*.<sup>(23)</sup> Nuevamente nuestros resultados fueron confirmados por Moore y su grupo<sup>(24)</sup> utilizando una nueva técnica de cultivo celular.

Más aún, pudimos comprobar que la exposición de los espermatozoides totalmente maduros, que se obtienen del *cauda* del epidídimo de la rata, a un anticuerpo específico para la proteína epididimaria DE<sup>(25)</sup> bloqueaba su capacidad fertilizante.<sup>(26)</sup>

La base fisiológica para la ocurrencia de este bloqueo se encuentra en los datos obtenidos sobre la localización ultraestructural de la proteína DE en el espermatozoide de la rata. Pudimos comprobar que la misma se ubica en la cara externa de la membrana plasmática en la región de la cabeza de la célula.<sup>(27)</sup> Si bien parte de esta proteína se pierde durante la capacitación y reacción acrosomal, una proporción importante permanece en la región posacrosomal de la membrana.

Esta localización y su comportamiento durante los eventos previos a la fertilización, permiten suponer que la proteína DE pueda jugar un papel tanto en la unión a la zona pelúcida como en la interacción con la membrana vitelina del ovocito.

Tomados en su conjunto, estos resultados permiten postular como hipótesis de trabajo que durante la maduración se arma, o completa, en la superficie del espermatozoide un sitio específico para el reconocimiento y unión a la zona pelúcida homóloga. Postulamos también que las glicoproteínas secretorias andrógeno-dependientes del epidídimo desempeñan un importante papel en este proceso.

Utilizando el sistema modelo descrito comenzamos el estudio de la existencia de proteínas secretorias que respondiesen a la estimulación con andrógenos y que interactuasen con los espermatozoides.

Luego de un difícil trabajo, entorpecido por la gran variación individual observada entre los epidídimos humanos, pudimos identificar por su movilidad electroforética en geles de poliacrilamida, 5 bandas de proteínas cuya síntesis era consistentemente estimulada por el agregado de andrógenos al medio de cultivo en una serie de 20 muestras de tejidos diferentes (figura 5).<sup>(28)</sup>

Estas proteínas eran sintetizadas por el tejido correspondiente a los segmentos iniciales (*caput* y *corpus*) del epidídimo y presentaban pesos moleculares en el rango 14-69 kDa, puntos isoeléctricos a pH ácido y reaccionaban con la concanavalina A, lo que sugiere la presencia de restos de manosa expuestos, o sea que se trata de glicoproteínas.

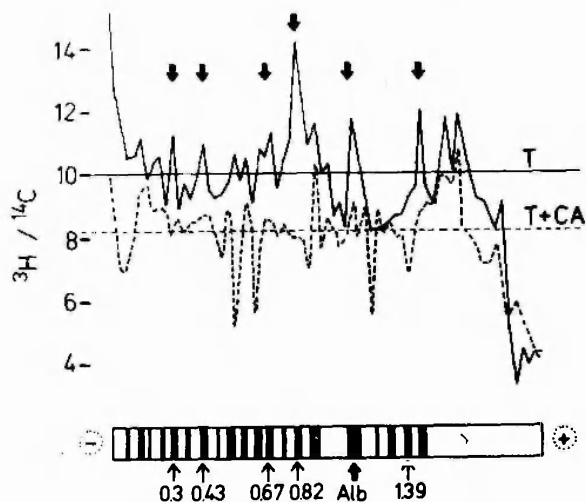


Figura 5. Identificación de proteínas andrógeno-dependientes en tubulos epididimarios humanos en cultivo. [Tezón y col., 1982<sup>[41]</sup>.]

Algunos resultados preliminares nos permitieron establecer que era posible extraer tres bandas proteicas, con características similares a las producidas por el epidídimo, de la superficie de espermatozoides maduros y que no estaban presentes en los espermatozoides inmaduros. Esta evidencia era sugerente del origen epididimario de esas bandas, las que serían incorporadas

a la superficie del espermatozoide durante su tránsito por el órgano.

Para poder continuar con el estudio de este fenómeno produjimos un antisuero policlonal, en conejo, contra estos antígenos. Luego de adsorber las inmunoglobulinas que reaccionaron con semen de donantes vasectomizados, el antisuero fue capaz de reconocer espermatozoides obtenidos del epidídimo y eyaculados y también al tejido epididimario. En cambio, no hubo reacción con el testículo ni componente alguno del epitelio germinal, la próstata y la vesícula seminal.<sup>[29]</sup>

Un análisis detallado de la localización de los antígenos en el espermatozoide permitió establecer que se los hallaba en la superficie de la membrana plasmática en la zona que recubre al acrosoma y que su cantidad aumenta a medida que los espermatozoides pasan por los sucesivos segmentos del epidídimo.<sup>[29]</sup>

Este antisuero ha sido utilizado en dos trabajos de investigación clínica con el fin de averiguar cuál es la significación biológica de la presencia de estas proteínas en la superficie de los espermatozoides.

En el primero examinamos comparativamente el contenido de antígenos y su localización en un grupo de donantes fértiles y un grupo de pacientes estériles. Encontramos que en los hombres fértiles, 88 % de los espermatozoides presentaba los antígenos localizados sobre el capuchón acrosomal, mientras que un subgrupo de pacientes (11/26; 40 %) presentaba una localización preferentemente extra-acrosomal de los antígenos (figura 6) y, simultáneamente, una disminución significativa del contenido de dichos antígenos medida por citofluorometría de flujo (figura 7).<sup>[30]</sup>

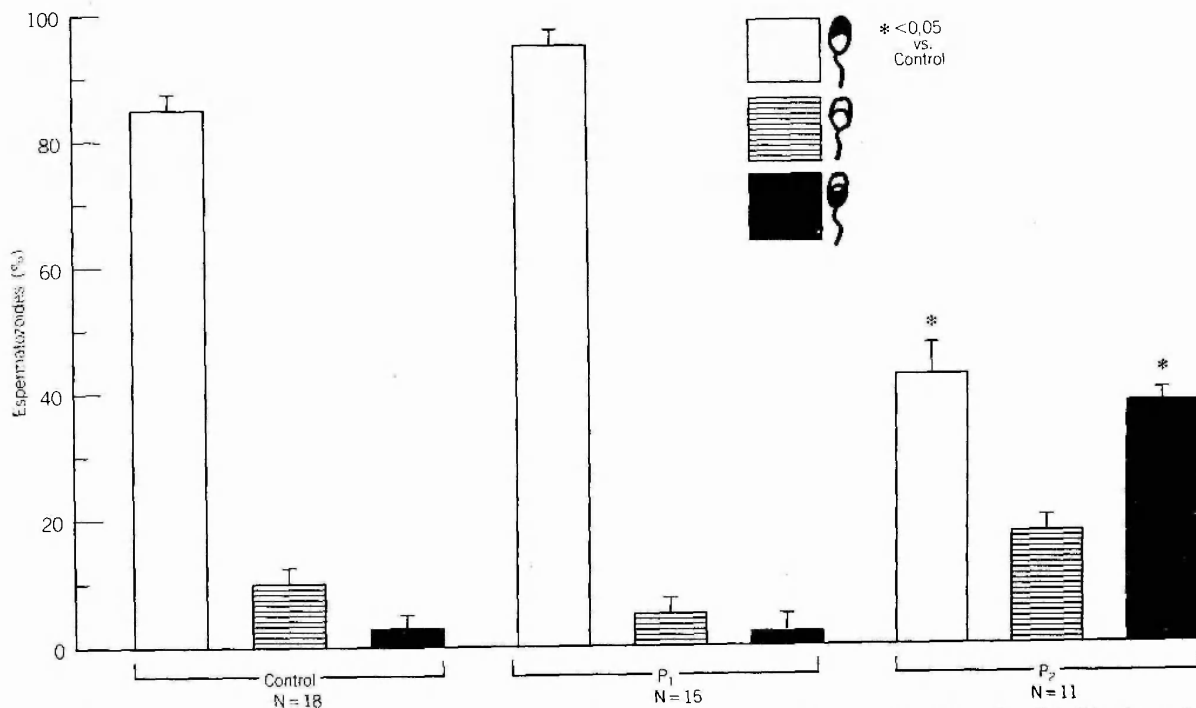


Figura 6. Localización de antígenos epididimarios en espermatozoides de donantes fértiles (control) y pacientes estériles (P<sub>1</sub> y P<sub>2</sub>). [Blaquier y col., 1987<sup>[30]</sup>.]



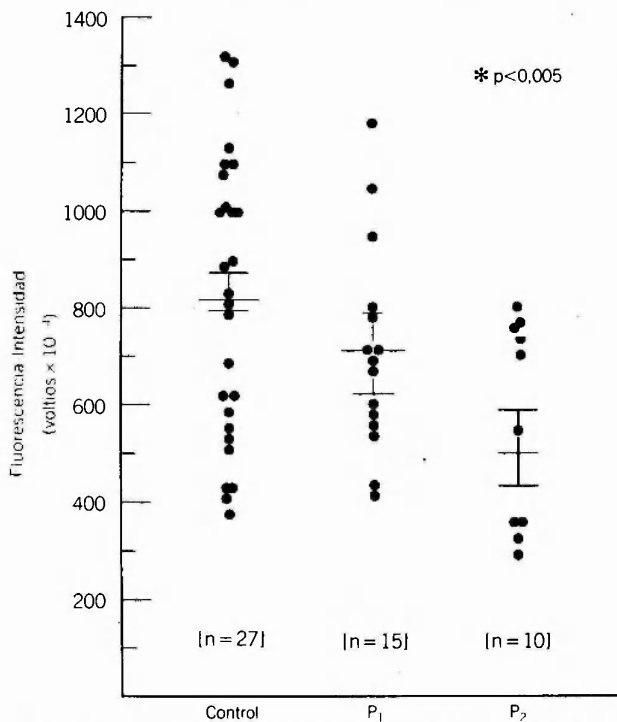


Figura 7. Determinación cuantitativa de antígenos epididimarios en espermatozoides de hombres normales y pacientes estériles (P<sub>1</sub> y P<sub>2</sub>). [Blaquier y col., 1987<sup>(10)</sup>.]

Estos resultados, si bien preliminares, sugieren una posible relación entre la localización anormal y contenido disminuido de antígenos en los espermatozoides y la esterilidad de estos pacientes.

El segundo trabajo fue realizado con los pacientes que ingresaron a nuestro programa de Fertilización *in vitro* y tuvo por objeto determinar el comportamiento de los antígenos en los espermatozoides durante la capacitación y su relación con la capacidad fertilizante. Para esto obtuvimos pequeñas alícuotas de espermatozoides a distintos tiempos del proceso de capacitación, como ser: del semen, luego de la selección por *swim up*, luego de incubación por 18 horas en medio capacitante y, finalmente, luego de incubación 18 horas con los ovocitos a fin de obtener fertilización. En todos ellos medimos contenido de antígeno, por medio de un ensayo ELISA desarrollado en nuestro laboratorio, y determinamos la localización de los antígenos por inmunofluorescencia.

Los resultados sugieren una relación directa entre la velocidad a la cual se pierden los antígenos de la superficie de los espermatozoides durante la capacitación y la fertilidad. Por ejemplo, un grupo de 5 pacientes que fertilizaron 100 % de los ovocitos de sus esposas puestos a fertilizar, presentó 37 % de espermatozoides con antígenos luego del *swim up* y sólo 7 % luego de la incubación con ovocitos (una disminución de 76 %). En contraste, 4 pacientes que obtuvieron muy baja fertilización (28 %, 20 %, 0 %, 0 %) tuvieron 77 % de los espermatozoides con antígenos de superficie luego del *swim up* y 49 % luego de la incubación con ovocitos (una caída de 27 %).<sup>(31)</sup>

Estos resultados son de difícil interpretación puesto que sugieren que los antígenos tendrían un papel en la estabilización del acrosoma. Sin embargo, también indican las posibilidades del sistema modelo desarrollado para contribuir al estudio de la fisiología del epidídimo y entender mejor las alteraciones de la fertilidad en el hombre.

## Bibliografía

- Young, W. C.: "A study of the function of the epididymis. III. Functional changes undergone by spermatozoa during their passage through the epididymis and vas deferens in the Guinea pig". *J. Exptl. Zool.*, 8:151, 1931.
- Bedford, J. M.: "Effects of duct ligation on the fertilizing ability of spermatozoa from different regions of the rabbit epididymis". *J. Exptl. Zool.*, 166:271, 1967.
- Bedford, J. M.; Clavin, H., y Cooper, G. W.: "The maturation of spermatozoa in the human epididymis". *J. Reprod. Fertl.*, Suppl. 18:199, 1973.
- Belonoschkin, B.: "Biologie der spermatozoa in menschlichen hoden und nebenhoden". *Arch Gynal.*, 174:357, 1942.
- Yanagimachi, R.; Yanagimachi, H., y Rogers, B. J.: "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, 1976.
- Hinrichsen, M. J., y Blaquier, J. A.: "Evidence supporting the existence of sperm maturation in the human epididymis". *J. Reprod. Fertl.*, 60:291, 1980.
- Moore, H. D. M.; Hartman, T. D., y Pryor, J. P.: "Development of the oocyte penetrating capacity of spermatozoa in the human epididymis". *Int. J. Androl.*, 6:310, 1983.
- Barros, C.; González, J.; Herrera, E., y Bustos Obregon, E.: "Human sperm penetration into zona free hamster oocytes as a test to evaluate the sperm fertilizing ability". *Andrologia*, 11:197, 1979.
- Hinrichsen Kohane, A. C.; Hinrichsen, M. J., y Schill, W. B.: "Molecular events leading to fertilization: a review". *Andrologia*, 16:321, 1984.
- Blaquier, J.: "The influence of androgens on protein synthesis by cultured rat epididymal tubules". *Acta Endocr. (Kobenh.)*, 79:403, 1975.
- Tezón, J. G., y Blaquier, J. A.: "The organ culture of human epididymal tubules and their response to androgens". *Molec. Cell. Endocrinol.*, 21:233, 1981.
- Purvis, K.; Calandra, R.; Sander, S., y Hansonn, V.: "Androgen binding proteins and androgen levels in the human testis and epididymis". *Int. J. Androl.*, 1:531, 1978.
- Tezón, J. G.; Cuasnicu, P. S.; Scorticati, C., y Blaquier, J. A.: "Development and characterization of a model system for the study of epididymal physiology in man". En: "Physiopathology of hypophysial disturbances and diseases of reproduction", editado por A. F. De Nicola, J. A. Blaquier y R. Soto. Alan R. Liss, Nueva York, p. 251, 1982.
- Tezón, J. G.; Vázquez, M.; Pineiro, L.; de Larminat, M. A., y Blaquier, J. A.: "The effect of androgens in the human epididymis in organ culture". En: "Therapy in Andrology", editado por G. Menchini Fabris, W. Pasini y L. Martini. Excerpta Medica, Amsterdam, p. 53, 1982.
- Gurpide, E.: "Superfusion". En: "Methods in Enzymology", editado por B. O'Malley y J. Hardman. Academic Press, Nueva York, vol. XXXVI, part A, p. 75, 1975.
- Vázquez, M. H.; de Larminat, M. A.; Gurpide, E.; Scorticati, C., y Blaquier, J. A.: "Androgen metabolism in the human epididymis. Effect of in vivo estrogen administration". *J. Steroid Biochem.*, 25:239, 1986.
- de Larminat, M. A.; Monsalve, A.; Charreau, E. H.; Calandra, R. S., y Blaquier, J. A.: "Hormonal regulation of 5-reductase activity in rat epididymis". *J. Endocrinol.*, 79:157, 1978.
- Tezón, J. G., y Blaquier, J. A.: "Androgens control androgen binding sites in rat epididymis". *Endocrinology*, 113:1025, 1983.
- de Larminat, M. A.; Scorticati, C.; Rennie, P. S., y Bruchofsky, N.: "Androgen receptor assay in small biopsies of human prostate. Preservation of nuclear receptor from rat ventral prostate by lyophilization". En: "Hormones and Cancer", editado por E. Gurpide, R. Calandra, C. Levy y R. Soto. Alan R. Liss, Nueva York, p. 247, 1984.
- Vázquez, M. H.; de Larminat, M. A., y Blaquier, J. A.: "Effect of androgens on androgen receptors in cultured human epididymis". *J. Endocrinol.*, 111:343, 1986.
- Orgebin-Crist, M. C., y Fournier Delpech, S.: "Sperm-egg interaction: evidence for maturational changes during epididymal transit". *J. Androl.*, 3:429, 1982.
- Cuasnicu, P. S.; González Echeverría, F.; Piazza, E. D.; Pineiro, L., y Blaquier, J. A.: "Epididymal proteins mimic the androgenic effect on zona pellucida recognition by immature hamster spermatozoa". *J. Reprod. Fertl.*, 71:427, 1984.
- González Echeverría, F.; Cuasnicu, P. S.; Piazza, E.; Pineiro, L., y Blaquier, J. A.: "Addition of anandrogen-free epididymal protein extract increases the ability of immature hamster spermatozoa to fertilize in vivo and in vitro". *J. Reprod. Fertl.*, 71:433, 1984.
- Moore, H. D. M., y Hartman, T. D.: "In vitro development of the fertilizing ability of hamster epididymal spermatozoa after co-culture with epithelium from the proximal cauda epididymis". *J. Reprod. Fertl.*, 78:347, 1986.
- Cameo, M. S., y Blaquier, J. A.: "Androgen controlled specific proteins in rat epididymis". *J. Endocrinol.*, 69:47, 1976.
- Cuasnicu, P. S.; González Echeverría, F.; Piazza, A.; Cameo, M. S., y Blaquier, J. A.: "Antibodies against epididymal glycoproteins block fertilizing ability in rat". *J. Reprod. Fertl.*, 72:567, 1984.
- Cameo, M. S.; González Echeverría, F.; Blaquier, J. A., y Burgos, M. H.: "Immunohistochemical localization of epididymal protein DE on rat spermatozoa: Its fate after induced acrosome reaction". *Gamete Res.*, 15:247, 1986.
- Tezón, J. G.; Vázquez, M. H.; Pineiro, L.; de Larminat, M. A., y Blaquier, J. A.: "Identification of androgen induced proteins in human epididymis". *Biol. Reprod.*, 32:584, 1985.
- Tezón, J. G.; Ramella, E.; Cameo, M. S.; Vázquez, M. H., y Blaquier, J. A.: "Immunohistochemical localization of secretory antigens in the human epididymis and their association with spermatozoa". *Biol. Reprod.*, 35:591, 1985.
- Blaquier, J. A.; Cameo, M. S.; Stephany, D.; Piazza, A. D.; Tezón, J. G., y Sherins, R. J.: "Abnormal distribution of epididymal antigens on spermatozoa from infertile men". *Fertil. Steril.*, 47:302, 1987.
- Blaquier, J. A.; Cameo, M. S.; Cuasnicu, P. S.; González Echeverría, F.; Pineiro, L., y Tezón, J. G.: "The role of epididymal factors in human sperm fertilizing ability". En: "Proceedings of the V World Congress on In Vitro Fertilization and Embryo Transfer". *Annals of the New York Academy of Sciences*, en prensa.