

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR**

**"PROTEINAS DE SECRECION DEL EPIDIDIMO DE CONEJO:  
CARACTERIZACION Y REGULACION POR ANDROGENOS Y  
TEMPERATURA"**

**TESIS DOCTORAL  
FRANCISCO IGNACIO REGALADO SANCHEZ**

**MADRID, 1992**

Ponente: Sr. Dr. Prof. Ruiz F. López

TRIBUNAL

Presidente: Sr. Dr. Prof. Benito de los Hornos

Vocal: Sr. Dr. Prof. Puente

Vocal: Sr. Dr. Dr. Mota

Vocal: Sr. Dr. Prof. García Ruiz

Secretario: Sr. Dr. Prof. Rafael Mota

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR**

**"PROTEINAS DE SECRECION DEL EPIDIDIMO DE CONEJO:  
CARACTERIZACION Y REGULACION POR ANDROGENOS Y  
TEMPERATURA"**

Memoria que para optar al grado de  
Doctor en Farmacia  
presenta el licenciado

**FRANCISCO IGNACIO REGALADO SANCHEZ**

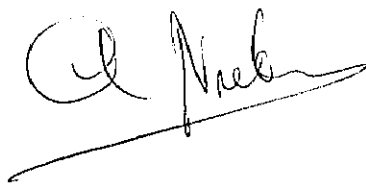
**MADRID, 1992**

**ANTONIO NIETO LOPEZ, Investigador Científico  
del Centro de Biología Molecular del C.S.I.C.**

CERTIFICA: que Francisco Ignacio Regalado Sánchez ha realizado bajo mi dirección el trabajo titulado  
" Proteínas de secreción del epidídimo de conejo: caracterización y regulación por andrógenos y temperatura".

Considero el trabajo realizado satisfactorio y apto para ser presentado como tesis doctoral en Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid

Y para que así conste donde proceda, expido el presente certificado en Madrid a doce de Junio de mil novecientos noventa y dos.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'A Nieto', with a long horizontal line extending from the end of the signature.

ABREVIATURAS

## ABREVIATURAS

<b>A<sub>260</sub></b>	-	absorbancia a 260 nm
<b>AcH</b>	-	ácido acético
<b>BAPNA</b>	-	benzoyl-L-arginina- <i>p</i> -nitroanilida
<b>BCIP</b>	-	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
<b>cDNA</b>	-	ácido desoxirribonucleico complementario
<b>Ci</b>	-	curio
<b>DMEM</b>	-	medio esencial mínimo de Dulbecco
<b>DNA</b>	-	ácido deoxirribonucleico
<b>DNS-Cl</b>	-	cloruro de dansilo
<b>dT</b>	-	deoxitimidina
<b>DTT</b>	-	ditiotreitól
<b>EDTA</b>	-	ácido etilen-diaminotetracético
<b>g</b>	-	gravidades
<b>HPLC</b>	-	cromatografía líquida de alta resolución
<b>IgG</b>	-	inmunoglobulina G
<b>mRNA</b>	-	ácido ribonucleico mensajero
<b>NBT</b>	-	nitro blue tetrazolium
<b>NTCB</b>	-	ácido 2-nitro, 5 tiocianobenzoico
<b>PAGE</b>	-	electroforesis en gel de poliacrilamida
<b>PBS</b>	-	ClNa 154mM tamponado con fosfato 1mM
<b>PBS-D</b>	-	PBS con 1% Triton X-100 (v/v)
<b>PBS-ov</b>	-	PBS con 4% ovoalbúmina (p/v)
<b>PBS-T</b>	-	PBS con 0.05% Tween-20 (v/v)
<b>PPO</b>	-	2,5-difeniloxazol
<b>p / v</b>	-	peso/volumen
<b>RNA</b>	-	ácido ribonucleico
<b>SAB</b>	-	seroalbúmina bovina
<b>SDS</b>	-	dodecil sulfato de sodio
<b>TCA</b>	-	ácido tricloroacético
<b>TEMED</b>	-	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
<b>TFA</b>	-	ácido trifluoroacético
<b>TLC</b>	-	cromatografía en capa fina
<b>u</b>	-	unidad
<b>v / v</b>	-	volumen/volumen

INDICE

## INDICE

### **INTRODUCCION**

<b>1. EL EPIDIDIMO: ESTRUCTURA</b>	<b>1</b>
<b>2. FUNCION DEL EPIDIDIMO</b>	<b>3</b>
2.1.- Maduración del espermatozoide en el epidídimo	3
2.2.- Capacidad fertilizante	3
2.2.1.- <i>Motilidad del espermatozoide</i>	4
2.2.2.- <i>Capacitación</i>	4
2.2.3.- <i>Reacción acrosomal</i>	5
<b>3. PRODUCTOS DE SECRECION DEL EPIDIDIMO Y SU REGULACION</b>	<b>7</b>
3.1.- Secreción y resorción de proteínas epididimales	7
3.1.1.- <i>Origen de las proteínas epididimales</i>	7
3.1.1.1.- Torrente circulatorio	7
3.1.1.2.- Fluído testicular	8
3.1.1.3.- Biosíntesis epitelial	8
3.1.2.- <i>Precursores para la síntesis proteica</i>	8
3.1.2.1.- Aminoácidos	8
3.1.2.2 - Azúcares	9
3.1.2.3.- Fosfato	9
3.1.3.- <i>Secreción proteica en el epidídimo</i>	9
3.1.4.- <i>Resorción proteica en el epidídimo</i>	10
3.2.- Regulación androgénica de proteínas epididimales de secreción	11
3.3.- Regulación por temperatura de la función del epidídimo	13
<b>4. LOS RETINOIDES EN LA FUNCION DEL TESTICULO Y EPIDIDIMO</b>	<b>15</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>18</b>
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	
<b>1. MATERIALES</b>	<b>20</b>
1.1.- Animales de experimentación	20
1.2.- Productos	20



<b>2. METODOS</b>	21
2.1.- Tratamientos	21
2.2.- Espermatozoides y fluido epididimal	21
2.3.- Cultivo de explantes	22
2.4.- Electroforesis en geles de poliacrilamida	22
2.5.- Técnicas inmunológicas	22
2.5.1.- <i>Preparación de anticuerpos</i>	23
2.5.1.1.- Anticuerpos contra antígenos totales	23
2.5.1.2.- Anticuerpos contra antígenos purificados	23
2.5.2.- <i>Inmunotransferencia ("Western blotting")</i>	23
2.5.3.- <i>Inmunoprecipitación</i>	24
2.5.4.- <i>Inmunomicroscopía electrónica</i>	24
2.6.- Aislamiento de RNA celular total	25
2.7.- Obtención de poli (A) <sup>+</sup> RNA	25
2.8.- Ensayos de traducción <i>in vitro</i> en sistemas libres de células.	25
2.9.- Determinación de receptores de andrógenos	25
2.10.- Purificación de proteínas del fluido epididimal	26
2.11.- Purificación de acrosina	27
2.12.- Ensayos para la detección de la actividad antiproteasa	28
2.12.1.- <i>Utilización de substratos naturales:</i> <i>azocaseína</i>	28
2.12.2.- <i>Utilización de substratos sintéticos:</i> <i>substratos conjugados a la 4-</i> <i>nitroanilida.</i>	29
2.12.3.- <i>Métodos de difusión radial</i>	29
2.13.- Mapas peptídicos	29
2.13.1.- <i>Proteolisis enzimática</i>	29
2.13.2 <i>Separación de los péptidos trópicos</i>	29
2.14.- Ensayos de unión a retinol y ácido retinoico	30

## RESULTADOS

<b>1. BIOSINTESIS Y REGULACION DE PROTEINAS DE SECRECION EPIDIDIMALES</b>	31
1.1. Marcaje y análisis de proteínas de secreción	31
1.2. Diferencias regionales en la secreción de proteínas epididimales	34
1.3. Regulación por andrógenos	34
1.4. Regulación por el desarrollo	37
1.5. Regulación por temperatura	37

1.6. Traducción de poli (A)+RNA en sistemas libres de células	39
1.7. Cuantificación del receptor de andrógenos en el epidídimo	42
<b>2. CARACTERIZACION DE PROTEINAS DEL FLUIDO EPIDIDIMAL</b>	42
2.1. Purificación de isoformas de 21 KDa que ligan ácido retinoico	42
2.2.- Caracterización de las isoformas II y III	43
2.2.1.- <i>Determinación de Mr</i>	43
2.2.2.- <i>Análisis de aminoácidos y azúcares. Secuenciación</i>	46
2.2.3.- <i>Mapas peptídicos</i>	46
2.3.- Actividad antiproteasa en el fluido epididimal	46
2.3.1.- <i>Actividad antiproteasa a lo largo del proceso de purificación.</i>	46
2.3.2.- <i>Regulación androgénica del inhibidor epididimal de proteasas</i>	52
2.3.3.- <i>Especificidad de la actividad antiproteasa</i>	52
2.3.3.1.- Frente a proteasas convencionales	52
2.3.3.2.- Frente a proteasas del espermatozoide	52
<b>3. ASOCIACION DE LA EP21 A LA SUPERFICIE DEL ESPERMATOZOIDE</b>	57
3.1.- Caracterización de anticuerpos	57
3.2.- Inmunomicroscopía electrónica de la EP21 en el espermatozoide	61
 <b>DISCUSION</b>	
<b>1. BIOSINTESIS DE PROTEINAS DE SECRECION: REGULACION POR ANDROGENOS Y POR TEMPERATURA.</b>	63
<b>2. PRESENCIA DE PROTEINAS CON CAPACIDAD DE UNION A ACIDO RETINOICO EN EL EPIDIDIMO DE CONEJO.</b>	67
<b>3. ACTIVIDAD ANTIPROTEASA EN EL FLUIDO EPIDIDIMAL.</b>	68
<b>4. LOCALIZACION DE PROTEINAS EPIDIDIMALES DE SECRECION ASOCIADAS A LA SUPERFICIE DEL ESPERMATOZOIDE.</b>	69

<b>CONCLUSIONES</b>	72
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	73

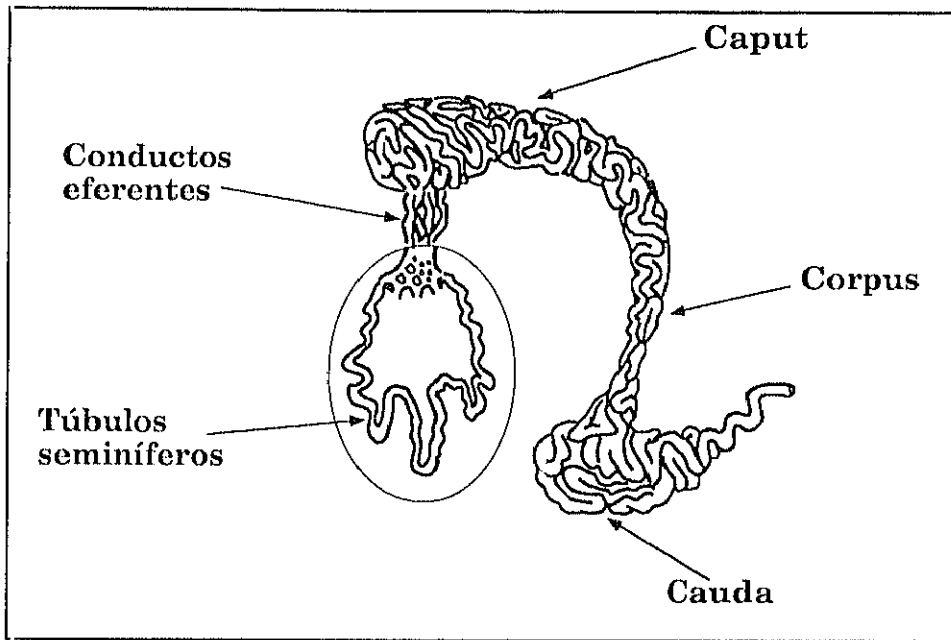
# INTRODUCCION

El epidídimo es un órgano de vital importancia en la biología de la reproducción, adquiriendo día a día un mayor protagonismo en los diferentes estudios encaminados a esclarecer el papel que desempeña en estos procesos. Las contribuciones del epitelio epididimal son esenciales para la adquisición del poder fertilizante del espermatozoide [Bedford, 1975 #63; Orgebin-Crist, 1975 #73] aunque todavía no se han identificado los factores responsables de este proceso. Este hecho se debe en parte a la dificultad que entraña el relacionar cambios específicos del espermatozoide con la obtención de la capacidad fertilizante por el mismo, puesto que la maduración del espermatozoide lleva consigo modificaciones morfológicas y bioquímicas, estando sólo alguna de ellas directamente asociada con la capacidad que posteriormente adquiere para penetrar el oocito [Bedford, 1975 #63; Leese, 1988 #15]. Por otra parte, el lumen epididimal contiene gran variedad de compuestos, muchos de los cuales pueden ser necesarios para un mantenimiento adecuado de la viabilidad del espermatozoide, sin que necesariamente se desarrolle alteración alguna en su función

## 1. EL EPIDIDIMO: ESTRUCTURA

El epidídimo forma un conducto único pero extraordinariamente plegado, de tal manera que su enorme longitud ocupa muy poco espacio, que conecta el testículo con las vías seminales inferiores. Así, el epidídimo es, al principio, vía de paso de los espermatozoides que salen del testículo y en su parte final se convierte en la principal zona de almacenamiento de estos espermatozoides.

Desde largo tiempo atrás, son conocidas las diferencias estructurales existentes entre epidídimos procedentes de diferentes especies [Hamilton, 1975 #99], aunque en la mayoría los casos se pueden distinguir claramente tres áreas anatómicas: una "cabeza" principal (caput) que recibe espermatozoides y fluido de los vasos eferentes testiculares, un "cuerpo", más estrecho (corpus o istmo), que conecta la cabeza con una "cola" globosa (cauda) que se encarga de almacenar el espermatozoide hasta la eyaculación (Fig 1). Los conductos eferentes, que conectan los túbulos testiculares con el epidídimo, participan en procesos de resorción y secreción de material al fluido luminal. El segmento medio del epidídimo, representado por gran parte del caput más el corpus, interviene directamente en la maduración del espermatozoide. Por último, el segmento terminal, que comprende la cauda más el tubo deferente proximal, se encarga del almacenamiento del espermatozoide fértil. El epitelio de ambos



**Fig. 1. Morfología del epidídimo de conejo; conexión con la red tubular del testículo.**

segmentos está implicado en procesos de absorción y secreción [Orgebin-Crist, 1987 #1; Moore, 1981 #57]. Este epitelio está formado por dos tipos principales de células: células principales predominantes y pequeñas células basales, cuya función hoy día se desconoce. En el segmento inicial se encuentran también las llamadas células apicales y en todo el ducto existen "células halo". Las células principales contienen un gran aparato de Golgi y numerosos microvilli en su zona apical. Igualmente se pueden encontrar macrófagos en el epitelio en cuestión.

En términos generales, todo el fluido que llega al epidídimo a partir del testículo sufre un proceso de reabsorción en los conductos eferentes y la parte inicial del caput. De esta forma se origina un aumento de concentración espermática en la suspensión luminal. Las células principales secretan compuestos específicos y enzimas hacia el fluido luminal que provocan modificaciones en la membrana plasmática y estructuras internas del espermatozoide, así como en sus funciones, haciendo que se conviertan en células móviles y fértiles.

Todavía no se conoce con exactitud el lugar concreto dentro del epidídimo de conejo al que debe ser transportado el espermatozoide para alcanzar un determinado umbral fecundante para el oocito.

## **2. FUNCION DEL EPIDIDIMO**

### **2.1.- Maduración del espermatozoide en el epidídimo**

El epidídimo aporta tanto las secreciones como el tiempo necesario para que el espermatozoide inmaduro que abandona el testículo se convierta en una célula madura con capacidad de fertilización del oocito. Los procesos de resorción que tienen lugar en el epidídimo pueden igualmente modificar el espermatozoide de forma que pueda interactuar con las diferentes secreciones circundantes. Durante su tránsito por este órgano, los espermatozoides desarrollan su capacidad de fertilización tanto "in vivo" como "in vitro", pudiéndose encontrar en el corpus distal del epidídimo de conejo poblaciones de espermatozoides capaces de penetrar en un gran porcentaje los oocitos correspondientes. Una vez que tal capacidad es adquirida, no se producen aumentos significativos de la misma en regiones más distales del epidídimo [Overstreet, 1974 #100].

### **2.2.- Capacidad fertilizante**

### 2.2.1.- *Motilidad del espermatozoide*

La inducción de la capacidad del espermatozoide, dentro del propio conducto epididimal, para sufrir un aumento progresivo de su motilidad, es de vital importancia para que éstos puedan negociar con éxito el cérvix o la juntura uterotubal. Los cambios en la composición intracelular del espermatozoide, parecen ser directamente responsables del incremento en la motilidad, estando el epidídimo directamente implicado en la facilitación de estos cambios por medio de un aporte o eliminación de iones o cofactores que actúan sobre el flagelo (Brokaw, 1987 #26). La capacidad para desarrollar una "motilidad hiperactivada" en las proximidades del oocito, debe igualmente desarrollarse durante el tránsito epididimal ([Overstreet, 1974 #100]).

### 2.2.2.- *Capacitación*

La capacitación es un proceso "pre-fertilización" necesario y sin el cual los espermatozoides, incluso cuando alcanzan la madurez, son incapaces de fertilizar el oocito (ya sea por alteraciones en la unión o en la penetración posterior en la zona pelúcida). Inicialmente se describió la capacitación como un período de residencia en el tracto femenino precisado por el espermatozoide para poder fecundar los oocitos recién ovulados ([Chang, 1984 #101]). La capacitación es un evento reversible protagonizado por "factores de decapacitación" que, de acuerdo con diferentes hipótesis, actuarían sobre espermatozoides previamente capacitados en el tracto femenino; la naturaleza de tales factores comprende péptidos, glicoproteínas y lípidos ([Davis, 1983 #102]).

Durante la capacitación tienen lugar una serie de cambios en la superficie del espermatozoide, que van desde una reducción de la carga en la superficie de la membrana hasta cambios que se traducen en una alteración en las propiedades de unión al oocito. Probablemente representen variaciones en las unidades carbohidratadas más expuestas al exterior, cambios puestos de manifiesto a través de estudios que revelan modificaciones en sus propiedades de unión a lectinas ([Brown, 1983 #65; Moore, 1981 #57])

Numerosos estudios han dado a conocer las alteraciones que sufren las proteínas de membrana durante la capacitación (cambios en la distribución de anticuerpos dirigidos contra estas proteínas [Brown, 1983 #65], reajustes de partículas intramembrana, y pérdidas de proteínas de alto peso molecular del espermatozoide capacitado



[Bearer, 1990 #98; Oliphant, 1979 #29; Overstreet, 1974 #100]). El epidídimo juega un papel decisivo en la consecución de este proceso; igualmente, los andrógenos promueven la incorporación de aminoácidos en proteínas epididimales específicas que son secretadas al lumen y que posteriormente se asocian a la superficie del espermatozoide maduro ([Brooks, 1980 #37; García, 1988 #77; Zeheb, 1984 #30]).

La capacitación, por tanto, refleja una fase de ciertas acciones epididimales encaminadas a prevenir la expresión fuera de tiempo de propiedades que adquiere el espermatozoide una vez que madura. La estabilización de la membrana celular del espermatozoide por adsorción de proteínas o esteroides secretados por el epidídimo se revierte en el tracto femenino, de forma que los procesos postcapitación ocurren en las cercanías del oocito recién ovulado

### 2.2.3.- *Reacción acrosomal*

El término "reacción acrosomal" se refiere a un conjunto de cambios que tienen lugar en el acrosoma y que se traducen en la liberación de su contenido de enzimas hidrolíticos y la exposición de una nueva membrana limitante de la porción anterior de la cabeza del espermatozoide, procesos esenciales para la fertilización ([Bedford, 1978 #103; Chang, 1984 #101; Bearer, 1990 #98]). La membrana plasmática del espermatozoide se fusiona con la membrana acrosomal externa localizada inmediatamente por debajo, dando lugar a la aparición de vesículas membranosas. Sin embargo, el origen de los cambios que tienen lugar durante la reacción acrosomal no está esclarecido por el momento. La vesiculación de la membrana de la cabeza del espermatozoide ocurre gracias a que las membranas implicadas están lo suficientemente cerca como para fusionarse, y, aunque se ha sugerido por diferentes autores la participación del citoesqueleto en este proceso ([Olson, 1983 #143]), aún no se conoce el grado de implicación microtubular. Algunos datos apuntan a que ciertos cambios en la composición de la membrana la hacen más susceptible para la fusión. Podría darse una mayor explicación a este punto si se conociera con exactitud la composición de las membranas participantes en la fusión, aunque se sabe, gracias a diferentes estudios bioquímicos, que la membrana acrosomal externa contiene más colesterol y una menor actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa que la membrana plasmática. Una de las principales consecuencias de la reacción acrosomal es la liberación de enzimas ([Zaneveld, 1970 #13]), entre los que merece mención especial la denominada acrosina ([Bradford, 1981

#104; Johnson, 1983 #105]). La acrosina es una proteasa con capacidad para digerir la zona pelúcida, aunque el hecho de que el espermatozoide pueda penetrar en zonas resistentes a acrosina y tripsina puede explicarse mediante la acción de otros enzimas acrosomales como la arilsulfatasa, que puede estar implicada directamente en el proceso de penetración. La acrosina está presente en el espermatozoide epididimal maduro en forma de un precursor denominado proacrosina, que puede estar localizado en la membrana acrosomal interna ([Bradford, 1981 #104]), en la matriz acrosomal, o en ambas ([Johnson, 1983 #105]). Es liberada mediante autoactivación de la proacrosina una vez que tiene lugar la disrupción acrosomal o bien por acción de un enzima, la acrolisina. La liberación prematura del enzima se evita gracias al bajo pH existente en ciertos compartimentos acrosomales o mediante inhibidores de tripsina endógenos localizados en células espermáticas que no presentan este pH ácido. Igualmente se ha demostrado que alguno de estos inhibidores se pierde durante la capacitación ([Goodpasture, 1981 #106]).

Los inhibidores de proteasas están presentes en múltiples formas y numerosos tejidos. Su función fisiológica principal es evitar proteólisis no deseadas, aunque en general, no se tienen excesivos detalles sobre el papel que desempeñan. Con la excepción de las macroglobulinas, que inhiben proteinasas de todo tipo, se puede afirmar que los inhibidores proteicos actúan gracias a un determinado mecanismo característico de cada una de las diferentes clases. Entre todos éstos, los mejor caracterizados son los inhibidores de serín-proteasas, que interaccionan con las proteasas de acuerdo con un mecanismo común. En la superficie de cada molécula inhibidora existe un puente peptídico a nivel del sitio activo, que se combina con el enzima, haciendo las veces de substrato para ésta.

En el complejo estable enzima-inhibidor el sitio activo se encuentra todavía intacto y el estado conformacional de los residuos que lo circundan se corresponde con el óptimo para un substrato. Estos sitios activos son muy rígidos y los cambios producidos durante la interacción de cada uno de los componentes del complejo enzima-inhibidor son mínimos.

Es característico de estos inhibidores la presencia de varios sitios reactivos homólogos en la misma cadena polipeptídica, y, por otro lado, que el hecho de sustituir un aminoácido por otro en esta región, conduce a un cambio en la actividad inhibidora. La hipervariabilidad de estos sitios activos a lo largo del proceso evolutivo, está en claro contraste con la evolución de los sitios activos de otras proteínas, que

se manifiestan como altamente conservados, del mismo modo que sustituciones a ese nivel, originan una pérdida total en su actividad.

Durante los últimos años se ha sugerido que la función fisiológica de los inhibidores de proteasas en las secreciones de las glándulas accesorias masculinas está relacionada con la fertilización ([Tschesche, 1974 #134; Goodpasture, 1981 #106]). Estos compuestos inhiben acrosina y su eliminación parece estar involucrada en el proceso de capacitación ([Goodpasture, 1981 #106]).

Se acepta de forma general que los espermatozoides no entran en contacto con estos inhibidores hasta que no se produce la eyaculación. Sin embargo, el haber encontrado altas concentraciones de inhibidores de tripsina en el fluido epididimal de carnero y cerdo puede indicar que el espermatozoide se encuentra expuesto a altas concentraciones de inhibidores de tripsina desde el momento que abandona el testículo.

Mediante ensayos de marcaje, se han localizado inhibidores exógenos de acrosina en la membrana acrosomal interna, mientras que los inhibidores exógenos anteriormente mencionados actúan solamente sobre la fracción soluble del enzima, enfatizando este hecho la importancia de la forma ligada del enzima durante la fertilización.

### 3. PRODUCTOS DE SECRECIÓN DEL EPIDÍDIMO Y SU REGULACIÓN

#### 3.1.- Secreción y resorción de proteínas epididimales

Como se ha mencionado con anterioridad, las diferentes aportaciones del epitelio del epidídimo son imprescindibles para la adquisición de la capacidad fertilizante por parte del espermatozoide ([Bedford, 1975 #63 y Orgebin-Crist, 1975 #73]). A continuación y de forma resumida, se comentará el origen y los procesos de resorción y secreción para los factores proteicos implicados.

##### 3.1.1.- *Origen de las proteínas epididimales*

###### 3.1.1.1.- Torrente circulatorio

La mayoría de las proteínas del fluido del epidídimo son diferentes a las que se encuentran en el plasma sanguíneo o en el fluido testicular ([Brooks, 1980 #37]) aunque existe en el fluido una

importante cantidad de seroalbúmina no procedente de las células epididimales ([Regalado, 1989 #76]).

### 3.1.1.2.- Fluído testicular

El fluído testicular es otra fuente de proteínas plasmáticas que entran en el lumen epididimal, dado que las células de Sertoli secretan varias proteínas que han sido encontradas en el plasma sanguíneo. Las proteínas del fluído testicular que no se degradan por enzimas proteolíticos en el lumen epididimal y que no atraviesan las células epiteliales, se concentran gracias al proceso de resorción de agua que tiene lugar en la luz del epidídimo, no apareciendo en éste si se procede a la ligación de los conductos eferentes testiculares. Entre éstas cabe citar la ABP (Proteína de Unión a Andrógenos) y una serie de productos proteicos de secreción de las células de Sertoli (transferrina, ceruloplasmina, "clusterina", proteínas con capacidad de unión a retinol y ciertos factores de crecimiento).

### 3.1.1.3.- Biosíntesis epitelial

Aquellas proteínas que persisten en el epidídimo una vez ligados los conductos eferentes, son de un claro origen epididimal. La síntesis y secreción de proteínas epididimales en ausencia de testículos (castración), aporta datos adicionales sobre la función biosintética epididimal. Las células principales del caput poseen un contenido proteico más elevado que las células basales o los fibroblastos, sugiriendo este hecho su actividad de biosíntesis. Las células principales del corpus, en términos generales, son más activas que las del caput en el proceso de síntesis proteica.

## 3.1.2.- *Precursores para la síntesis proteica*

### 3.1.2.1.- Aminoácidos

A lo largo del epidídimo existe una reserva de aminoácidos libres, localizándose una parte en el propio lumen epididimal. Una fuente importante de aminoácidos es el torrente circulatorio, mediándose en general el tránsito compartimental por transportadores específicos. La  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa, uno de los diferentes enzimas responsables del transporte de aminoácidos a través de las membranas celulares, está presente en el epidídimo de conejo a nivel de los estereocilios, lugar comunmente asociado con el movimiento de sustancias desde el

lumen al torrente circulatorio y a nivel intercelular. Todos los aminoácidos presentes en altas concentraciones en el lumen epididimal basan su mecanismo de transporte en procesos de ósmosis, pudiendo ser utilizados posteriormente como precursores de proteínas.

Muchos son los estudios "in vitro" que han demostrado la incorporación de aminoácidos en proteínas epididimales ([Jones, 1981 #5, Regalado, 1989 #76]), concluyéndose de forma general que la capacidad de biosíntesis y los productos proteicos del epidídimo varían a lo largo de sus diferentes regiones.

### 3.1.2.2 Azúcares

La mayoría de trabajos que recientemente han aportado nuevos datos sobre la procedencia de los componentes glucídicos epididimales, se han centrado en el estudio y origen del ácido siálico presente en el epidídimo, encontrándose éste presente mayoritariamente incorporado en sialoproteínas del lumen epididimal. Las altas actividades galactosil, glicosil y sialiltransferasa que muestra el epidídimo pueden ser responsables de la incorporación de los correspondientes restos glucídicos en proteínas.

### 3.1.2.3.- Fosfato

Aunque se desconoce hoy día cuál puede ser la importancia de las formas fosforiladas de ciertas proteínas epididimales de secreción, parece claro que la fosforilación tiene lugar en el aparato de Golgi (de forma previa al proceso de secreción). La incorporación de restos fosfatados en proteínas de secreción de diferentes sistemas se postula como una modificación postraduccional. Se podría especular que un mecanismo similar opera igualmente en el epidídimo ([Mongkolsirikieat, 1984 #14])

### 3.1.3.- *Secreción proteica en el epidídimo*

Puesto que el espermatozoide epididimal posee una capacidad limitada para la síntesis "de novo" de macromoléculas, la fuente mayoritariamente responsable de las modificaciones en la superficie de la membrana del espermatozoide es el propio epitelio epididimal. Este hecho se comprueba a través de diferentes datos que muestran como el epidídimo secreta distintas proteínas que pueden unirse al espermatozoide ([Brooks, 1985 #31; Moore, 1981 #57; García, 1988 #77]). Igualmente se observan diferencias en el ritmo de transporte

que podrían reflejar una maquinaria biosintética desigual en las células epididimales ([Brooks, 1983 #39; Olson, 1985 #40; Regalado, 1989 #76; Flickinger, 1981 #94; Jones, 1980 #68; Brooks, 1983 #39; Orgebin-Crist, 1987 #1]). En resumen, podemos decir que una gran variedad de proteínas es sintetizada y secretada por el epitelio epididimal, algunas de las cuales se adhieren de forma específica al espermatozoide en el proceso de maduración mientras que otras no presentarían especificidad alguna. Existen proteínas que influyen sobre la motilidad del espermatozoide, otras, por lo que hoy se conoce, aumentan su capacidad para reconocer el oocito, actuando como factores de decapitación que previenen la reacción acrosomal. Un gran número de enzimas está presente en el fluido luminal, siendo secretadas algunas de ellas directamente por el epidídimo, pudiendo modificar la superficie del espermatozoide y estando posiblemente involucradas en la interacción de éste con la zona pelúcida. La síntesis de proteínas de secreción específica está sujeta a variaciones regionales de tal manera que algunas proteínas son sólo sintetizadas en una región y no en otras ([Jones, 1981 #5; Thomas, 1984 #6]). Otras veces la especificidad regional no es tan acusada y determinadas proteínas son sintetizadas en todo el epidídimo aunque con claras diferencias de intensidad ([Regalado, 1989 #76; Haro, 1988 #70; Jones, 1981 #5]). Estos hechos indican diferenciaciones celulares regionales mucho más importante de lo que sugiere la estructura de su epitelio. La identificación y función de estas proteínas de secreción está muy poco avanzada. Dos de estos polipéptidos unen ácido retinoico ([Newcomer, 1990 #113]) y podrían ser transportadores de esta sustancia. La estructura del cDNA para una proteína de 24 KDa sintetizada en el epidídimo del ratón es conocida, pero no la funcionalidad de la misma ([Faure, 1991 #145]). El conocimiento de la biosíntesis de proteínas epididimales de secreción es importante para la posterior identificación y caracterización de su posible papel fisiológico.

#### 3.1.4.- *Resorción proteica en el epidídimo*

Se ha demostrado que las células principales ([Gerard, 1988 #21]) están implicadas en la resorción de proteínas lumbales del epidídimo; estas inclusiones celulares no se encuentran cuando se procede a la ligación del corpús, lo que sugiere que serían secretadas en porciones anteriores donde se unirían al espermatozoide. Esta observación implica que o bien la cantidad de glicoproteína secretada por el epidídimo está relacionada con el número de espermatozoides

luminales, o, por otro lado, que la captación de proteínas por parte del epitelio se ve inhibida por el flujo de las secreciones testiculares. Las proteínas unidas al espermatozoide no solo no atraviesan la barrera de las células epiteliales, sino que éstas, que en algún momento contuvieron tales proteínas, son capaces de digerirlas.

### **3.2.- Regulación androgénica de proteínas epididimales de secreción**

La diferenciación, crecimiento, y actividad secretora de las glándulas del aparato reproductor masculino, dependen fundamentalmente de andrógenos provenientes del testículo. En los últimos años, la identificación de marcadores bioquímicos altamente sensibles y específicos que permiten calibrar los efectos de la testosterona en estos tejidos, ha aportado información concluyente sobre los sucesos tempranos que, a nivel molecular, tienen lugar durante la acción de las hormonas esteroides ([Higgins, 1978 #47; Higgins, 1978 #52]). La adquisición de la capacidad fertilizante y el poder de supervivencia del espermatozoide son fenómenos andrógeno-dependientes ([Orgebin-Crist, 1975 #73]). Los andrógenos son igualmente importantes para el mantenimiento de la integridad morfológica y funcional del epidídimo. Estas acciones androgénicas son resultado directo de interacciones con receptores de andrógenos que están presentes en concentraciones variables a lo largo del conducto epididimal ([Toney, 1988 #2]), receptores que se caracterizan por un alto grado de especificidad, una baja tasa de disociación de los andrógenos que unen, y por la unión competitiva manifestada por antiandrógenos para ligarse a sus mismos sitios de unión. La interacción de la hormona con el correspondiente receptor, conduce a un cambio en la síntesis del mRNA que codifica para proteínas específicas reguladas por andrógenos. Este control de la síntesis proteica en los tejidos diana a través de una regulación de la concentración celular de mensajero, varía según el tejido del que se trate. Así por ejemplo, en la próstata la testosterona aumenta preferencialmente la cantidad de mRNA que codifica para las principales proteínas de secreción, mientras que en la vesícula seminal ejerce una respuesta generalizada estimulando de forma local la síntesis de proteínas. Cabe mencionar igualmente que el perfil de proteínas epididimales de secreción es considerablemente más complejo que el de la próstata o vesículas seminales, donde la secreción se asocia a un número limitado de proteínas. Adicionalmente, el epidídimo desarrolla una respuesta pequeña a andrógenos,

considerando la tasa global de síntesis proteica, en relación a próstata y vesículas seminales ([Brooks, 1980 #37]). Sólo unas cuantas proteínas epididimales de secreción son andrógeno-dependientes, según ponen de manifiesto las técnicas comunmente utilizadas, si bien otras proteínas de respuesta a andrógenos puedan estar presentes, quedando su detección enmascarada por proteínas coincidentes sin respuesta alguna al control androgénico. Mediante el análisis de los productos de traducción y con sondas de cDNA específicas se pueden identificar especies de mRNA cuya concentración pueda verse alterada hormonalmente ([D'Agostino, 1980 #35; Faure, 1991; Brooks, 1986 #22]). También mediante marcaje con aminoácidos radiactivos se observan diferencias de síntesis ([Jones, 1981 #65; Orgebin-Crist, 1987 #107; Toney, 1988 #127; Regalado, 1989 #116]). Los andrógenos pueden tanto inhibir como inducir la síntesis de determinadas proteínas ([Orgebin-Crist, 1987 #1; Regalado, 1989 #76]).

En diferentes trabajos, se han cuantificado los cambios ultraestructurales que tienen lugar en el epitelio epididimal en el período inicial en el que los espermatozoides almacenados se convierten en infértiles después de la castración. Estos ensayos muestran como al perder los espermatozoides su vitalidad, las células principales de la cauda y del caput sufren una serie de cambios producto del cese en la producción de macromoléculas y un aumento en su actividad lisosomal. Por el contrario, las células apicales del caput no sufren alteraciones importantes transcurrido un tiempo después de la castración. Se puede especular por tanto, que las células principales suponen el soporte fundamental del epidídimo, constituyendo la secreción, más que la resorción, su función andrógeno-dependiente principal.

A diferencia de la próstata y las vesículas seminales, cuyo suministro androgénico procede del torrente circulatorio y linfático, el epidídimo recibe un aporte adicional de andrógenos directamente del testículo a través del fluido testicular. Esta testosterona del fluido testicular, que se encuentra en concentraciones mucho más elevadas a las plasmáticas, se cree es importante para el mantenimiento de una completa actividad de secreción y resorción en los segmentos inicial y proximal del caput.

Los receptores de andrógenos se encuentran igualmente presentes en el epidídimo inmaduro ([Toney, 1988 #2]), pudiendo actuar sobre la síntesis de proteínas tisulares mediante un fenómeno directamente dependiente del estadio de desarrollo epididimal. Por otro lado, se mantienen diversas hipótesis sobre el papel que los estrógenos pueden desarrollar en la regulación del tracto masculino



(por ejemplo, provocar un aumento en el tiempo de tránsito del espermatozoide a través del epidídimo). El receptor estrogénico sufre una serie de cambios en su coeficiente de sedimentación, según sea el estadio del desarrollo en que se encuentre, pasando desde una forma 8-9S bajo condiciones de baja fuerza iónica en el citosol epididimal preparado a partir de epidídimos inmaduros, hasta una forma 3-4S en el citosol epididimal obtenido utilizando animales sexualmente maduros. Aunque esta forma 3-4S del receptor puede unir estradiol, no podrá seguidamente interaccionar convenientemente con el correspondiente DNA, deduciéndose que el receptor estrogénico no es funcional en el epidídimo maduro. Esta condición del receptor estrogénico parece deberse a la inducción o activación de una proteasa específica en el animal maduro. Se ha demostrado recientemente que se trata de una proteasa andrógeno-dependiente, conduciendo el cese en el aporte de andrógenos a la aparición de la forma 8-9S del receptor estrogénico en todos los segmentos del epidídimo.

### **3.3.- Regulación por temperatura de la función del epidídimo**

Como se ha mencionado con anterioridad, la región terminal del epidídimo, la cauda, sirve como lugar de almacenamiento para los espermatozoides una vez que se completa su maduración, localizándose en esta parte más espermatozoides que en ninguna otra ([Amann, 1981 #107]). El almacenamiento parece depender de condiciones especiales creadas en la cauda epididimal. Los factores últimos responsables de las propiedades de este resguardo especializado no han sido por el momento identificados, pero desde luego son dependientes de dos factores primarios: andrógenos ([Orgebin-Crist, 1975 #106]) y la relativa baja temperatura (~32°C) de la cauda ([Glover, 1960; Foldesy, 1982]).

Aún en la actualidad resulta difícil explicarse el significado adaptativo de la condición escrotal y los mecanismos fisiológicos por los que se produce el descenso del testículo y epidídimo a un entorno más frío. Desde los primeros hallazgos (Moore y Fukui en 1923) en los que se indica cómo la función espermatogénica del testículo depende de una baja temperatura solamente posible en el escroto, un gran número de investigaciones se han centrado en el testículo. De esta forma, hoy día conocemos que muchos estadios del ciclo germinal son susceptibles a eventuales elevaciones de la temperatura. Diferentes trabajos se han centrado en el estudio de la regulación de la temperatura testicular, comprobándose que una elevación desde la

temperatura del testículo escrotal hasta la que presenta el abdomen, va acompañada de cambios en distintos sistemas metabólicos ([Bedford, 1978 #60]).

A diferencia del testículo, el interrogante sobre la posible dependencia térmica del epidídimo escrotal no ha recibido tanta atención, no pudiendo por el momento dar una explicación concreta sobre el efecto de la temperatura abdominal sobre la fisiología del epidídimo. Desde largo tiempo atrás se sabe que la colocación de ambos testículos y epidídimos en el abdomen conduce en cuestión de días a una pérdida de la capacidad fertilizante del espermatozoide epididimal maduro, del mismo modo que los cambios que se originan en respuesta a la temperatura abdominal, aparecen de forma más precoz en el espermatozoide inmaduro que en el maduro. Entre las diferentes consecuencias que origina la elevación térmica cabe mencionar las siguientes: efectos limitados sobre la secreción epididimal, cambios en la histología del epidídimo, en su contenido en ácido siálico y alteraciones en la incorporación de fenilalanina en proteínas. La estrecha dependencia funcional del epidídimo escrotal de la secreción testicular, hace que el descenso en el contenido de andrógenos y posiblemente otros productos en el testículo criptorquidizado, plantee ciertas dudas sobre la respuesta del epidídimo *per se* a la temperatura elevada. No se puede afirmar que un deterioro rápido del espermatozoide y otros cambios en el epidídimo sean causa directa de la temperatura abdominal o de una liberación hormonal inadecuada por fallo del testículo, sino que posiblemente ambos hechos estén conjuntamente implicados.

Estudios recientes ([Bedford, 1991 #7]), indican que la influencia de la temperatura abdominal sobre el epidídimo puede originar la supresión de determinadas macromoléculas del fluido epididimal que en condiciones normales se unen a la superficie del espermatozoide ([Esponda, 1986 #8]). Curiosamente, estas mismas variaciones del fluido se pueden provocar por castración. Por último, cabe mencionar que la exposición prolongada a la temperatura abdominal no modifica el transporte iónico en el epidídimo de conejo ([Jones, 1975 #108]), como fue sugerido en un principio. Es posible, pues, que la temperatura abdominal esté modificando la síntesis de proteínas de secreción de la cauda.

Es un fenómeno bien conocido y extensible a un gran número de células el que un aumento de la temperatura conlleva la expresión de los denominados genes de choque térmico. Estos genes codifican para productos proteicos que supuestamente actúan uniéndose a factores de naturaleza peptídica, tal y como se ha demostrado para el nucleolo y

componentes del retículo endoplásmico ([Wu, 1984 #140]). El análisis molecular de la expresión de los genes de choque térmico permite concluir que la mayoría de las proteínas de choque térmico (HSP) están presentes en la célula en condiciones normales, incrementándose su cantidad de forma considerable después de la inducción térmica. Por el momento, sin embargo, se desconocen las razones moleculares de la sensibilidad de las células germinales a la hipertermia. Si la función de las HSP y chaperoninas relacionadas es unirse a polipéptidos incompletos, no glicosilados o de conformación irregular, previniendo así la acumulación y el transporte de tales proteínas a los diferentes compartimentos celulares, podría pensarse en una cierta responsabilidad sobre los efectos secundarios que la elevación de la temperatura conlleva([Lemaire, 1991 #109]).

#### **4. LOS RETINOIDES EN LA FUNCION DEL TESTICULO Y EPIDIDIMO**

El retinol (Vitamina A) es un micronutriente esencial para el mantenimiento del testículo y el epidídimo así como un correcto funcionamiento de la espermatogénesis. Cuando cesa el aporte de vitamina A se produce una degeneración del epitelio germinal, un cese completo de la actividad espermatogénica y una serie de cambios morfológicos a nivel del epidídimo. Estos fenómenos se pueden revertir con un aporte de retinol, siendo inefectivo el ácido retinoico, metabolito importante del primero. En un principio se pensó que el ácido retinoico no tenía papel alguno en la espermatogénesis y la función testicular, sin embargo, se han encontrado cantidades importantes de ácido retinoico en el testículo de rata, conteniendo tanto testículo como epidídimo cantidades sustanciales de una proteína específica que liga ácido retinoico (CRABP) ([Ong, 1982 #110]).

Los cambios que se observan en el testículo cuando se suministra retinol o retinoico son diferentes, indicando que influyen sobre la expresión de ciertos genes de manera diferente. Por tanto, el retinol y el ácido retinoico seguramente tengan funciones independientes y específicas. Un hecho común para ambos es la existencia de proteínas específicas de unión. Las proteínas intracelulares de unión a retinol, CRBP, y al ácido retinoico, CRABP, presentan localizaciones celulares específicas. La CRBP se encuentra en abundancia en las células de

Sertoli del testículo ([Kato, 1985 #112; Porter, 1985 #111]) y en las células principales del caput epididimal ([Kato, 1985 #112]).

Además de estas proteínas intracelulares, se han encontrado algunas proteínas de unión a retinol relacionadas entre sí, aunque distintas a la RBP, secretadas por útero y endometrio en respuesta a progesterona ([Clawitter, 1990 #114]). Además, se han aislado del lumen epididimal de la rata dos proteínas que unen con alta afinidad ácido retinoico "todo-trans" ([Ong, 1988 #115]) (Tabla 1). Estas proteínas de secreción podrían funcionar como transportadores intercelulares de retinoides.

Por otra parte, el comprobado efecto de los retinoides sobre el aparato reproductor, se ve corroborado por la existencia en sus epitelios ([ De Luca, 1991 #144]) de un receptor para ácido retinoico que actúa como factor de transcripción modulando la expresión de genes específicos.

Todos estos datos sugieren un importante, sino indispensable, papel de los retinoides en el correcto funcionamiento del testículo y epidídimo.

PROTEINA	Mr APROXIMADO (KD)	LIGANDO PRINCIPAL	FUNCION SUGERIDA
RBP	21	Retinol	Transporte plasmático
IRBP	140	Retinol, retinal	Transporte intercelular en el ciclo visual
Cuatro proteínas secretadas en el útero de cerdo	22	Retinol	Transporte hacia el feto
Dos proteínas lumbales del epidídimo de rata	20	Acido retinóico	Transporte intercelular
CRBP (I)	16	Retinol	Donador en la reacción LRAT*, transporte intracelular
CRBP (II)	16	Retinol	Donador en la reacción LRAT*
CRBP (III)	15	Retinol	?

CRABP (I)	16	Acido retinoico	Transporte intracelular, regulación de la concentración de ácido retinoico libre
CRABP (II) de rata neonatal	15	Acido retinoico	Transporte intracelular, regulación de la concentración de ácido retinoico libre
CRABP (II) de pollo embrionario	16	Acido retinoico	Transporte intracelular, regulación de la concentración de ácido retinoico libre
CRALBP	36	Retinal	Reacciones enzimáticas en el ciclo visual
RAR $\alpha$	50	Acido retinoico	Factor de transcripción ligando-dependiente
RAR $\beta$	50	Acido retinoico	Factor de transcripción ligando-dependiente
RAR $\gamma$	50	Acido retinoico	Factor de transcripción ligando-dependiente
RXR $\alpha$	50	Acido retinoico	Factor de transcripción ligando-dependiente

**Tabla 1.** Proteínas de unión a retinoides.

\*Lecitina: retinol aciltransferasa

## OBJETIVOS

Los objetivos planteados en el presente trabajo son:

- 1.- Caracterización del patrón de proteínas de secreción en el epidídimo de conejo y estudio de las diferencias existentes entre las principales regiones epididimales, caput, corpus y cauda.
- 2.- Estudio de la regulación por andrógenos de las proteínas de secreción del epidídimo de conejo.
- 3.- Comparación de la regulación por andrógenos y por temperatura de la biosíntesis de las proteínas anteriormente mencionadas. Relación entre los mecanismos posiblemente implicados.
- 4.- Purificación, caracterización y papel fisiológico de proteínas epididimales seleccionadas en función de su control androgénico y térmico.
- 5.- Localización ultraestructural de proteínas de secreción epididimales asociadas a la superficie del espermatozoide proveniente de la cauda epididimal de conejo: implicaciones fisiológicas.

MATERIALES  
Y  
METODOS



## 1. MATERIALES

### 1.1.- Animales de experimentación

En los experimentos realizados, se utilizaron conejos machos de la raza New Zeland de unos ocho-diez meses de edad y aproximadamente tres-cuatro Kg de peso. Los conejos inmaduros eran de la misma raza y de un mes de edad. Por último, para la inmunización con antígenos epididimales, se emplearon ratas de la raza Wistar de unos 150 g de peso.

### 1.2.- Productos

El medio de cultivo DMEM fue suministrado por Gibco

La acrilamida, N,N' metilenbisacrilamida, persulfato amónico, TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina), 2-mercaptoetanol, Tween-20, SDS y urea son de Merck.

El azul de Coomassie R250, Negro Amido, NBT (Nitro Blue Tetrazolium: cloruro de 2,2' di-p-nitro-fenil-5,5'-difenil-3,3'-(3,3'-dimetoxi-4,4'-difenil) ditetrazolium), BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato), azul de bromofenol son de Serva.

El Tris,  $\alpha$ -cloronaftol, NTCB (Acido 2-nitro, 5 tiocianobenzoico), seroalbúmina bovina, ovoalbúmina bovina, Tritón X-100, azul de Coomassie G250, rojo Ponceau S y las proteínas marcadoras de peso molecular son de Sigma.

El inhibidor de RNasas es de Boehringer y el lisado de reticulocitos de Amersham y Promega-Biotec.

Los productos radiactivos: proteína A marcada con  $^{125}\text{I}$ , L-[ $^{35}\text{S}$ ] metionina, [ $^3\text{H}$ ] dihidrotestosterona son de Amersham.

Los anticuerpos IgG de rata dirigidos contra conejo y conjugados a peroxidasa y fosfatasa alcalina son de TAGO. El suero de conejo no inmune fue obtenido a partir de animales preinmunes. La proteína A conjugada a partículas de oro coloidal de 10 nm es de Jensen. La suspensión de *Staphylococcus aureus* es de Calbiochem-Behring

La nitrocelulosa es de Millipore y Schleicher & Schuell.

Las películas para autorradiografía son de Agfa (Curix RP2) y Kodak (X-Omat).

Las sales orgánicas e inorgánicas, y solventes orgánicos no citados son de Merck, Sigma y Carlo Erba.

## 2.- METODOS

### 2.1.- Tratamientos

- *Castración*: se llevó a cabo a través de una incisión escrotal.

- *Tratamiento con andrógenos*: inmediatamente después de la castración se inyectaron intramuscularmente 20 mg de Testoviron-Depot y 5 mg de propionato de testosterona (Schering AG.). Después de este primer tratamiento los animales reciben 5 mg diarios de testosterona.

- *Incremento térmico de la cauda*: según las técnicas estandar descritas ([Bedford, 1978 #60; Esponda, 1986 #8]). Tras practicar una incisión abdominal, la cauda y el corpus del epidídimo fueron separados del testículo y la cauda ligada a la pared abdominal anterior mediante una sutura, devolviendo seguidamente el testículo a la cavidad escrotal. El epidídimo contralateral permaneció en su situación natural, con el fin de utilizarlo como control, consiguiendo de esta forma obtener resultados de un mismo animal en cada experimento.

Los tratamientos descritos se prolongaron por un espacio de 15 días.

### 2.2.- Espermatozoides y fluido epididimal

Las caudas de conejo, previa separación del tejido adiposo circundante, fueron perfundidas con la ayuda de una bomba peristáltica por inyección retrógrada de medio esencial de Dulbecco (DMEM), a través del vaso deferente. El líquido perfundido así obtenido se centrifugó a 2000g y 4°C durante 5 min.. El sobrenadante, denominado fluido epididimal, se utilizó para inmunizaciones, análisis electroforéticos y para la purificación de proteínas, tal y como se describe más adelante.

El sedimento de espermatozoides fue cuidadosamente resuspendido en 1 ml de DMEM y centrifugado como en el caso anterior. El sedimento resultante fue lavado dos veces de la misma forma, para ser finalmente resuspendido en 0.1 ml de DMEM y usado para microscopía electrónica.

### 2.3.- Cultivo de explantes

El cultivo de explantes fue llevado a cabo esencialmente como se ha descrito para otros tejidos ([Nieto, 1980 #72; Fernández-Renau, 1984 #67]). Basicamente, el procedimiento consistió en cortar porciones del epidídimo en fragmentos (1-2 mm<sup>3</sup>) que se incubaron posteriormente a 35 °C en pequeños viales con 0.5 ml de DMEM. Salvo para los ensayos sobre la síntesis regional de proteínas, se tomaron explantes de diferentes regiones del epidídimo, juntándose en cada vial, con el fin de representar los procesos de síntesis y secreción de todo el epidídimo. La incubación se llevó a cabo en un baño con agitación bajo una atmósfera de 95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub>. Después de una incubación de 30 min., se sustituyó el medio y se añadieron 30 µCi de [<sup>35</sup>S]metionina (800 Ci/mmol); la incubación se continuó por un tiempo adicional de 3 h.. Seguidamente se tomó el medio de cada uno de los viales, centrifugándolo durante 10 min. a 10.000 g. Se separó el sobrenadante, apartándolo para determinaciones posteriores de proteínas de secreción. Los explantes de tejido se homogeneizaron en 1 ml de PBS que contenía 1% Triton X-100 (PBS-D), se centrifugó como en el caso anterior y se recuperó el sobrenadante. Posteriormente se tomaron porciones tanto de medio como de homogenado para la medida de la radiactividad incorporada a proteínas ([Nieto, 1980 #72]). Igualmente se tomaron pequeñas alícuotas para la determinación del contenido proteico tisular ([Bradford, 1976 #117; Lowry, 1951 #71]), para ensayos de inmunoprecipitación y análisis electroforéticos como se describirá más adelante.

### 2.4.- Electroforesis en geles de poliacrilamida

La electroforesis de proteínas (PAGE) en condiciones desnaturizantes se realizó en geles de poliacrilamida según el método de Laemmli (1970), utilizando geles de una concentración de acrilamida del 12.5% en presencia de SDS.

La electroforesis en condiciones no desnaturizantes se realizó exactamente de la misma manera pero omitiendo el SDS en todas las soluciones.

Los geles se tiñeron con azul de Coomassie según el método de Fairbanks *et al* (1981). Las proteínas marcadas radiactivamente se detectaron mediante fluorografía con PPO ([Bonner, 1974 #64]).

### 2.5.- Técnicas inmunológicas

## 2.5.1.- Preparación de anticuerpos

### 2.5.1.1.- Anticuerpos contra antígenos totales

Con el fin de obtener anticuerpos frente al mayor número de proteínas del fluido epididimal, se tomó una porción del mismo conteniendo del orden de 20  $\mu\text{g}$  de proteína y se emulsionó con un volumen igual de adyuvante completo de Freund. La emulsión así obtenida fue inyectada vía subcutánea en ratas Wistar. Al cabo de 10 días, los animales recibieron dosis similares, a intervalos semanales, utilizando en este caso adyuvante incompleto para preparar la emulsión. Aproximadamente al mes de la primera inyección se extrajo sangre de la vena caudal, se preparó el suero por coagulación y centrifugación y se chequeó el título de los anticuerpos mediante la técnica de inmunodifusión doble (Ouchterlony).

### 2.5.1.2.- Anticuerpos contra antígenos purificados

Para la obtención de antisueros específicos, las proteínas del fluido epididimal fueron separadas mediante SDS-PAGE como se describe en el apartado 2.4. Después de la tinción, se cortó el fragmento del gel (con 10-20  $\mu\text{g}$ ) conteniendo la banda proteica deseada, se neutralizó mediante sucesivos cambios en PBS y se procedió a su emulsificación con adyuvante de Freund, sirviéndose para ello de un homogeneizador. La vía y pauta de administración fueron similares a las descritas en el apartado anterior.

## 2.5.2.- Inmunotransferencia ("Western blotting")

Las proteínas separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida, en presencia de SDS, se transfirieron a filtros de nitrocelulosa según el método de Towbin y *col.*, (1979). Los filtros se tiñeron entonces con 0.2% rojo Ponceau en 3% TCA, se fotografiaron y se destiñeron con PBS. A continuación los filtros se saturaron durante 1 h. con PBS conteniendo 0.05% Tween-20 (v/v) (PBS-T) y 1% SAB (p/v); la incubación con el primer anticuerpo diluido (1/100) se efectuó durante 3-16 h. a 25°C. Después de varios cambios con PBS-T, se incubaron los filtros durante 2 h. con el anticuerpo conjugado a peroxidasa (conejo anti-[IgG de rata]). Finalmente, los filtros se volvieron a lavar exhaustivamente con PBS-T. La reacción de la peroxidasa se desarrolló en 50 mM Tris-HCl pH 7.5 con  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\alpha$ -cloronaftol.

En algunos experimentos se utilizó en lugar de un segundo anticuerpo, proteína A de *Staphylococcus aureus* marcada radiactivamente con  $^{125}\text{I}$  ([Burnette, 1981 #121]). La incubación con esta proteína (0.1  $\mu\text{Ci/ml}$ , en PBS-T) se realizó durante 20 min. a temperatura ambiente. Los filtros se sometieron a varios lavados con PBS-T y posteriormente se expusieron sobre películas para autorradiografía.

### 2.5.3.- Inmunoprecipitación

La inmunoprecipitación de las proteínas marcadas procedentes de los explantes incubados (apartado 2.3 de "Métodos") se efectuó según procedimientos anteriormente descritos ([Fernández-Renau, 1984 #67]). En resumen, se diluyeron en PBS-D diferentes porciones de los homogenados de explantes y se incubaron a 4°C durante toda la noche con antisuero o suero preinmune respectivamente. La inmunoprecipitación se llevó a cabo con cantidades crecientes de antisuero con el fin de asegurar una completa precipitación del antígeno radiactivo. El complejo antígeno-anticuerpo se precipitó con una suspensión de proteína A de *Staphylococcus aureus* y el sedimento obtenido se lavó varias veces con PBS-D (con centrifugaciones intermedias), para finalmente medir su radiactividad.

### 2.5.4.- Inmunomicroscopía electrónica

A la suspensión de espermatozoides lavados (0.1 ml, apartado 2.2 de "Métodos") se le fue añadiendo lentamente y con agitación suave 4% paraformaldehído en PBS frío hasta 2 ml. Se dejó reposar la mezcla a 4°C durante 1 h. y los espermatozoides ya fijados se recogieron por centrifugación y se trataron con 0.1 M glicina para bloquear cualquier resto de fijador. Las rejillas recubiertas de carbón coloidal se suspendieron durante 5 min. sobre gotículas de la suspensión de espermatozoides a analizar, tratando posteriormente las rejillas durante 15 min. con 4% ovoalbúmina en PBS (PBS-ov). Todos los pasos subsiguientes se realizaron con reactivos diluidos en PBS-ov. Las rejillas se incubaron durante 2 h. con el primer anticuerpo o suero preinmune respectivamente (diluidos ambos 1/200). Posteriormente, las rejillas se incubaron, después de un lavado previo, durante 1 h. con el segundo anticuerpo (conejo anti-[IgG de rata]) diluido 1/200. Después de lavados exhaustivos con PBS, las rejillas se incubaron 1 h con proteína A conjugada a oro coloidal diluida 1/40, se lavaron varias veces y se secaron al aire antes de proceder al examen en un microscopio electrónico Jeol 100B.

## 2.6.- Aislamiento de RNA celular total

Basicamente, se aplicó el procedimiento descrito por Brawerman ([Brawermann, 1974 #122]).

El tejido se congeló en N<sub>2</sub> líquido inmediatamente después de su extracción, se pulverizó en un mortero y se homogeneizó en 5 vol (p/v) de tampón de homogeneización (Tris-HCl 0.1M pH 9, SDS 0.5%, EDTA 2mM) y otros 5 volúmenes de fenol equilibrado en el tampón anterior hasta un pH de aproximadamente 9. Se efectuaron tantas fenolizaciones como fueron necesarias hasta obtener una total desproteinización.

Los ácidos nucleicos se obtuvieron mediante precipitación con etanol de la fase acuosa final, y el RNA fue separado del DNA, por solubilización en alta sal, bien NaAcO 3M o LiCl 2M. La concentración se determinó espectrofotométricamente, asumiendo que 25 u. de A<sub>260</sub> equivalen a 1mg/ml de RNA ([Maniatis, 1982 #123]).

## 2.7.- Obtención de poli (A)<sup>+</sup> RNA

Basicamente se llevó a cabo siguiendo el procedimiento de Lombardero y Nieto (1981). Brevemenete, el poli (A)<sup>+</sup> mRNA se aisló por cromatografía en Oligo (dT)-celulosa, en presencia de SDS. Con este método, aparentemente se obtienen mRNAs intactos, como se deduce a partir de ensayos de "Northern" llevados a cabo con sondas específicas de cDNA ([Haro, 1988 #70]).

## 2.8.- Ensayos de traducción *in vitro* en sistemas libres de células.

El poli (A)<sup>+</sup> RNA se tradujo utilizando lisados comerciales de reticulocitos de conejo, caracterizados por la reproductibilidad en la traducción de un amplio rango de RNAs mensajeros exógenos, utilizando las condiciones recomendadas por el fabricante. Los ensayos (volumen final de 50 µl) se incubaron durante 1 h. a 30°C en presencia de [<sup>35</sup>S]metionina; transcurrido este tiempo, se tomaron alícuotas para medir la radiactividad incorporada a proteínas y para SDS-PAGE de los productos totales. La inmunoprecipitación subsiguiente se llevó a cabo según se describe en el apartado 2.5.3.

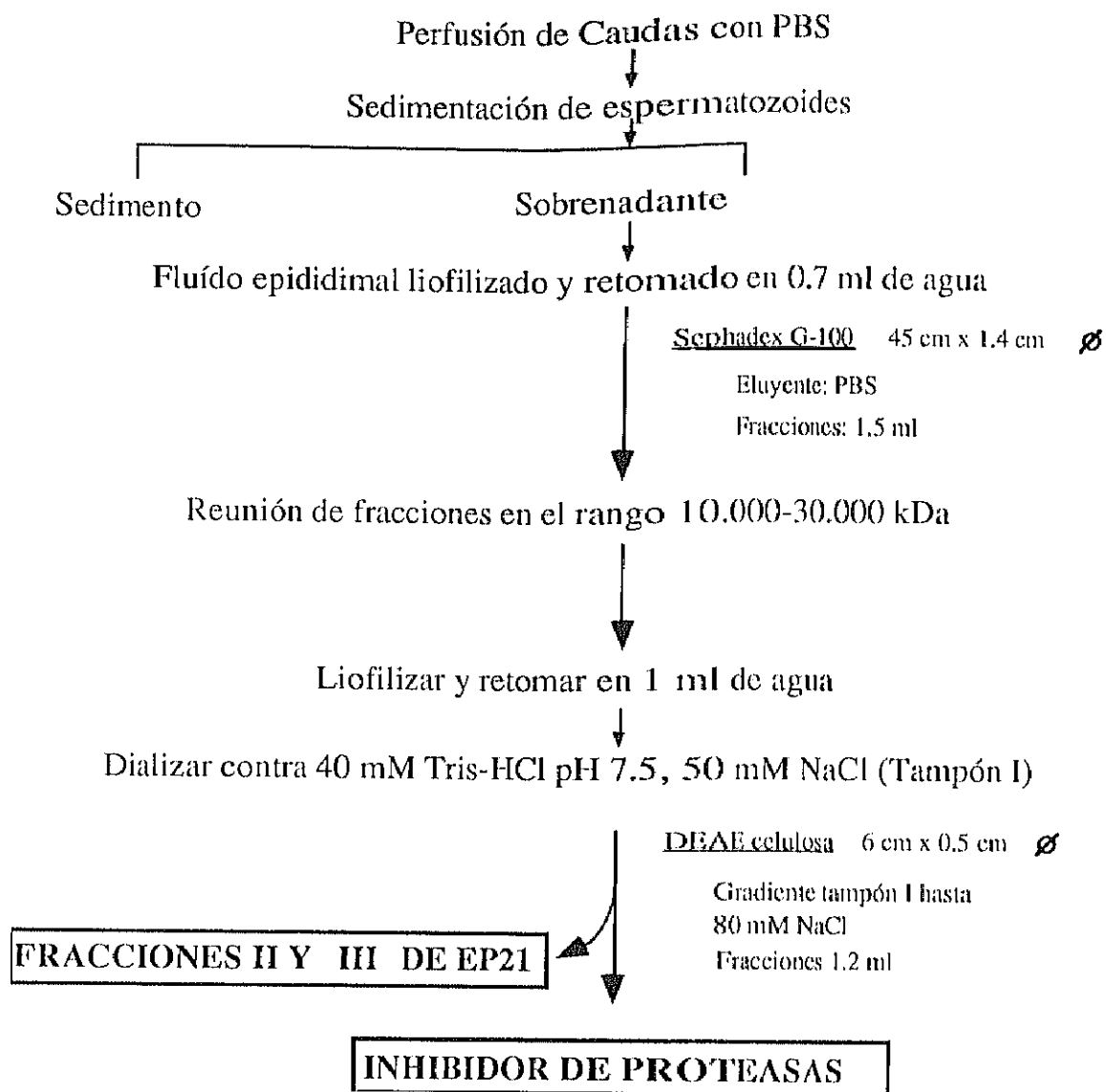
## 2.9.- Determinación de receptores de andrógenos

Puesto que el epidídimo contiene, además de receptores de andrógenos, proteínas con alta afinidad para andrógenos, se eligió una determinación basada en la unión específica de los receptores hormonales activados a DNA ligado a celulosa ([Sherman, 1984 #131; Yamamoto, 1985 #130]).

La cauda se homogeneizó en 5 volúmenes (p/v) de tampón TDG (2 mM DTT, 1 mM EDTA, 10% glicerol, 40 mM HCl-Tris, pH 7.5). El homogenado se centrifugó durante 1 h a 100.000 g, llevando el sobrenadante hasta saturación con 40% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Este tratamiento purifica parcialmente el receptor y lo convierte en una forma con capacidad de unión a DNA ([Chang, 1981 #132]). El precipitado proteico se resuspendió en tampón TDG y el receptor se marcó radiactivamente incubándolo a 0°C durante 2 h con 10 nM [ $^3\text{H}$ ]dihidrotestosterona. La hormona libre se adsorbió con carbón-dextrano ([Chang, 1981 #132]) y la solución se pasó lentamente por una columna de 0.5 ml de DNA-celulosa. Después de varios lavados con tampón TDG, el receptor ligado se eluyó con 0.5 M NaCl, determinándose la radiactividad que ha incorporado. En otro tipo de medidas, el precipitado de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  de receptor no marcado se purificó por medio de la DNA-celulosa, como se acaba de describir, ensayando el receptor eluído por el método del carbón dextrano ([Leake, 1987 #133]). Ambos tipos de medidas arrojaron resultados similares.

## 2.10.- Purificación de proteínas del fluido epididimal

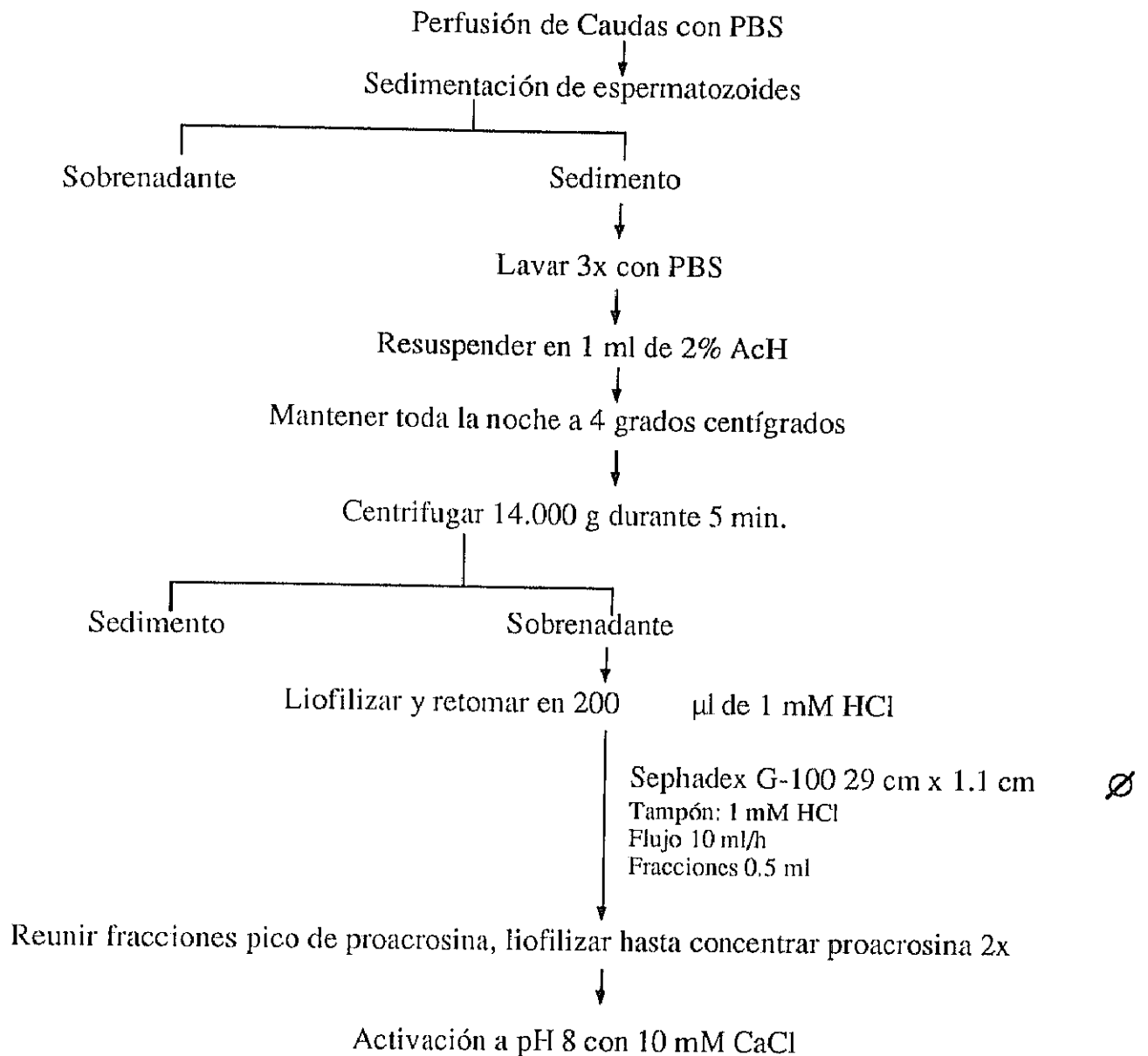
A continuación se presenta de forma esquemática el proceso llevado a cabo para la purificación de los distintos componentes proteicos epididimales que fueron de nuestro interés.



### 2.11.- Purificación de acrosina

Se siguió el procedimiento descrito por Kenneth *y col.* (1977) con ciertas modificaciones. El método se basa en la extracción de proacrosina de los espermatozoides en medio ácido. La proacrosina se autoactiva posteriormente en medio básico para dar acrosina. Brevemente el método consiste en:





## 2.12.- Ensayos para la detección de la actividad antiproteasa

### 2.12.1.- Utilización de substratos naturales: azocaseína

Basicamente el procedimiento utilizado fue el descrito por Sarath y col (1989). El sustrato coloreado (azocaseína) se incubó con un enzima proteolítico en presencia o ausencia del inhibidor de proteasas. La azocaseína no digerida se precipita con TCA y los péptidos solubles coloreados se miden espectrofotométricamente. La reacción se

mantiene 2 h a 37°C en obscuridad, parándose por adición de 300 µl de 10% TCA a cada tubo de reacción, que se mantendrán posteriormente 15 min. a 0°C para asegurar una completa precipitación de la azocaseína no digerida.

#### 2.12.2.- *Utilización de substratos sintéticos: substratos conjugados a la 4-nitroanilida.*

Para determinar actividad anti-tripsina se utilizó en ocasiones benzoil-L-arginina-*p*-nitroanilida (BAPNA) a una concentración de 1 mM (Sarath y col, 1989). La liberación de 4-nitro anilina se midió espectrofotométricamente.

#### 2.12.3.- *Métodos de difusión radial*

En líneas generales se aplicó el procedimiento descrito por Maerki y col. (1984). Básicamente el método consiste en ensayar la actividad antiproteasa en placas de agar gelificadas con adición de caseína, en las que se han practicado una serie de pocillos en los que se depositan el enzima y el inhibidor a ensayar. Por tinción posterior con Negro Amido se puede detectar en qué casos no aparece el halo correspondiente a la digestión trípica.

### 2.13.- Mapas peptídicos

#### 2.13.1.- *Proteolisis enzimática*

Se realizaron digestiones enzimáticas de las fracciones purificadas  $\alpha$  y  $\beta$  de la EP21. El procedimiento proteolítico con tripsina se llevó a cabo como se describe a continuación. La alícuota de la proteína a digerir (40-50 µg, en 50 µl) se calentó previamente a 100°C durante 3 min. para desnaturalizar la proteína. Se alcalinizó el medio con 200 mM  $\text{NH}_4\text{CO}_3$  pH 8.5 y se incubó 2x con 1.5 µg de tripsina durante 3.5 h. Finalmente, se liofilizó

#### 2.13.2 *Separación de los péptidos trípticos*

Los péptidos generados en la proteolisis con tripsina, se analizaron mediante HPLC o TLC.

En el primer caso se aplicaron a una columna de fase reversa C-18 de Nova-Pak (Waters) que se desarrolló con un gradiente de 0.1% TFA en agua y 0.1% TFA en acetonitrilo. La detección se realizó a 220 nm.

En el segundo caso, los péptidos se marcaron fluorescentemente con cloruro de dansylo (DNS-Cl) (Atherton y Thomson, 1969) y se separaron por cromatografía bidimensional en capa de Silica gel. El primer solvente fue Acetato de etilo/2-propanol/ $\text{NH}_4\text{OH}$  (9/7/4) y el segundo cloroformo/etanol/ácido acético (38/4/3). Los péptidos se visualizaron con luz ultravioleta

#### 2.14.- Ensayos de unión a retinol y ácido retinoico

El perfundido epididimal se incubó a  $0^\circ\text{C}$  en obscuridad durante 90 min. con  $5 \times 10^{-8}$  M de  $^3\text{H}$ -retinol o ácido retinoico y las proteínas del perfundido se purificaron según se describe en 2.10. Seguidamente, se midió la radiactividad en las fracciones de las cromatografías.

En los ensayos de saturabilidad de unión el perfundido se incubaba con concentraciones crecientes de  $^3\text{H}$ -ácido retinoico (hasta  $2.5 \times 10^{-5}$  M) y la cantidad ligada a las proteínas se determinaba midiendo la radiactividad y calculando a partir de la radiactividad específica del retinoico.

Para asegurarse que el producto unido era realmente ácido retinoico y no un metabolito producido durante la incubación, los picos de proteína con radiactividad asociada, se liofilizaron y se extrajeron con etanol. El extracto se desecó bajo  $\text{N}_2$  en obscuridad, se retomó en 2-5  $\mu\text{l}$  de etanol y se cromatografió en capa fina de poliamida desarrollada con metanol. En paralelo se colocó un patrón de  $^3\text{H}$ -ácido retinoico. Después de la cromatografía la placa se roció con  $\text{EN}^3\text{HANCER}$  y se autorradiografió.

## RESULTADOS

## 1. BIOSINTESIS Y REGULACION DE PROTEINAS DE SECRECION EPIDIDIMALES

En este apartado nos propusimos identificar las diferentes proteínas de secreción sintetizadas por el epidídimo y analizar su distribución en este órgano así como estudiar la regulación de su síntesis por diferentes factores. La metodología básica consistió en marcar las proteínas con un aminoácido radiactivo ( $[^{35}\text{S}]$  metionina), incubando "in vitro" explantes de epidídimo procedentes de animales controles, castrados, castrados + tratados hormonalmente, etc.. Las proteínas marcadas secretadas al medio de incubación se analizaron mediante electroforesis en gel.

### 1.1. Marcaje y análisis de proteínas de secreción

Con el objeto de analizar la síntesis de proteínas de secreción provenientes del epidídimo y liberadas al medio de incubación, se hizo necesario confirmar previamente que cualquier posible diferencia observada fuese debida a cambios en la propia tasa de síntesis, más que en la de secreción. Para ello, se establecieron las condiciones en las que las proteínas de secreción sintetizadas "de novo", marcadas radiactivamente durante un período de "pulso", eran liberadas completamente al medio después de un período de "caza". La Figura 2 muestra cómo durante un período de marcaje de 1.5 h, los explantes de cauda epididimal incorporan activamente  $[^{35}\text{S}]$ metionina en proteínas, algunas de las cuales son liberadas al medio. Después del período de "caza", donde se suplementa el medio con un exceso de metionina no marcada, se suprime la incorporación de radiactividad en proteínas celulares; sin embargo, las proteínas de secreción ya marcadas y almacenadas en el tejido continúan liberándose al medio, completándose tal secreción transcurridas las 4.5 h del período de caza. Aproximadamente el 8-10% de las proteínas epididimales marcadas es secretado al medio de cultivo.

Las proteínas marcadas secretadas al medio fueron analizadas por SDS-PAGE (Fig. 3) y los polipéptidos presentes en el fluido epididimal de conejo, se analizaron de la misma forma con el fin de utilizarlos como referencia (Fig. 3). Las bandas mayoritarias presentes en este fluido se corresponden con polipéptidos de los siguientes pesos moleculares: 110, 80, 66, 45, 35 y 21 KDa. Por su presencia abundante, se decidió obtener anticuerpos a partir de las proteínas de 21 KDa (denominadas por nosotros EP21) para análisis posteriores. Los polipéptidos sintetizados y secretados al medio presentaron pesos moleculares comprendidos entre 14 KDa y por encima de 100 KDa (Fig. 3), mostrándose como mayoritarios aquellos con pesos moleculares de 90, 45, 35, 28 y 21 KDa. Se puede

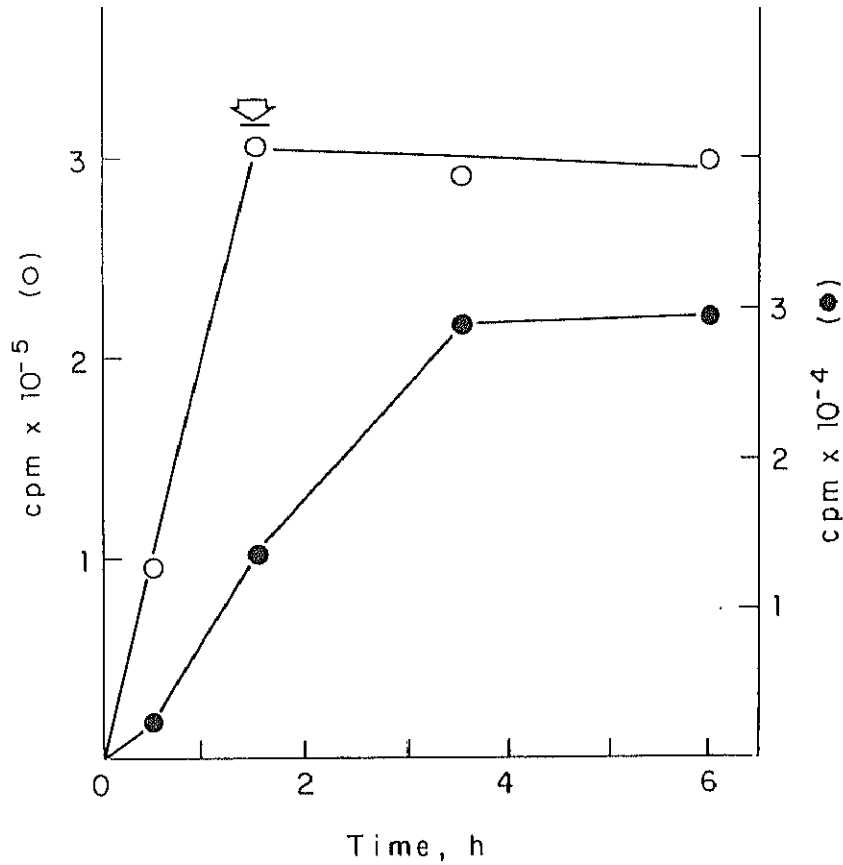


Fig. 2. Cinética de síntesis y secreción *in vitro* de proteínas epididimales. Explantes de epidídimo se incubaron *in vitro* en presencia de [<sup>35</sup>S]metionina, como se describe en Materiales y Métodos. Después de 1.5 h, los explantes se sometieron a un período de "caza" con un exceso de metionina no marcada (flecha). A los tiempos indicados, se tomaron porciones de tejido (O) y medio (●) para medir la radiactividad incorporada a proteínas. Los valores están referidos a 1 mg de proteína.

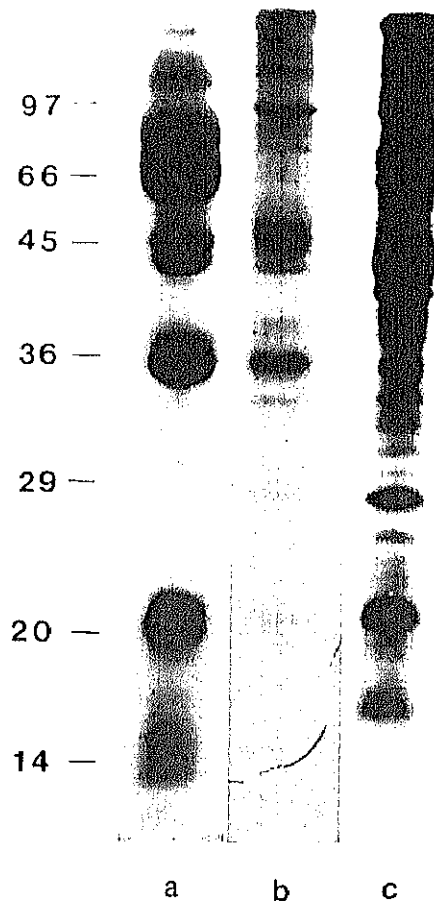


Fig. 3 . SDS-PAGE de los polipéptidos marcados radiactivamente, sintetizados y secretados por explantes epididimales. a: Tinción de proteínas procedentes del fluido epididimal; b: Fluorografía de las proteínas marcadas procedentes del medio de incubación; c: Fluorografía de las proteínas intracelulares procedentes de los explantes incubados.

El peso molecular (en kDa) de los marcadores se indica en la izquierda.

observar que alguno de ellos se corresponde con bandas proteicas del fluido epididimal anteriormente mencionadas. Otros polipéptidos de este fluido, que a primera vista no parece sean sintetizados y secretados por los explantes epididimales, seguramente tengan su origen en secreciones testiculares o del exudado intercelular. Así por ejemplo, el componente mayoritario de 66 KDa del fluido epididimal (Fig. 3) no parece ser sintetizado en el epidídimo (Fig. 3). Experimentos con anticuerpos específicos contra seroalbúmina de conejo demostraron que efectivamente este componente mayoritario era albúmina procedente del trasudado sanguíneo.

El análisis electroforético de las proteínas marcadas procedentes de homogenados de explantes, mostró un patrón complejo con un gran número de bandas radiactivas distribuidas a lo largo del gel (Fig. 3), sugiriendo que el origen de las proteínas marcadas del medio era debido a un proceso secretor y no a una liberación inespecífica de proteínas intracelulares debida a una posible degeneración y lisis de las células epididimales incubadas.

## **1.2. Diferencias regionales en la secreción de proteínas epididimales**

La Figura 4 muestra un patrón típico de polipéptidos sintetizados y secretados "in vitro" por las tres principales regiones del epidídimo. La EP21 se sintetiza y secreta fundamentalmente en el caput y en el corpus, incrementándose paulatinamente hacia la región de la cauda los polipéptidos de 90 y 35 KDa. Otros polipéptidos muestran variaciones de menor consideración, aunque debe mencionarse que se obtuvieron pequeños cambios sobre el patrón descrito entre los distintos animales estudiados. Para confirmar que las diferencias regionales encontradas para la EP21 eran causa directa de las variaciones sufridas por su tasa de síntesis, se realizaron inmunoprecipitaciones del contenido radiactivo total (tejido + medio) con los anticuerpos obtenidos para dicha proteína. En estos experimentos de inmunoprecipitación, la síntesis relativa de EP21 (expresada como porcentaje sobre la síntesis de proteínas totales) fue de un 4 y un 1.2% para caput y cauda respectivamente.

## **1.3. Regulación por andrógenos**

En la Figura 5 se muestra la influencia de los andrógenos sobre la síntesis y secreción de proteínas epididimales. La castración (Fig. 5) produce prácticamente la desaparición por



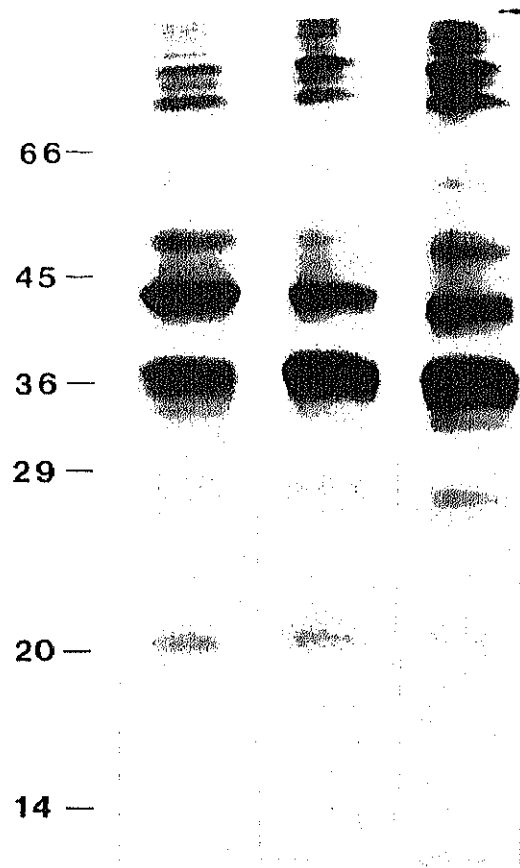


Fig. 4 . SDS-PAGE de los polipéptidos marcados secretados *in vitro* por explantes procedentes de los tres principales segmentos epididimales. Se aplicaron por pocillo aproximadamente 30.000 cpm de proteína radiactiva del medio de incubación. Después de la electroforesis, se procesó el gel por fluorografía. **a**: Caput; **b**: Corpus; **c**: Cauda. En la parte izquierda se indica el peso molecular (en KDa) de los marcadores utilizados.

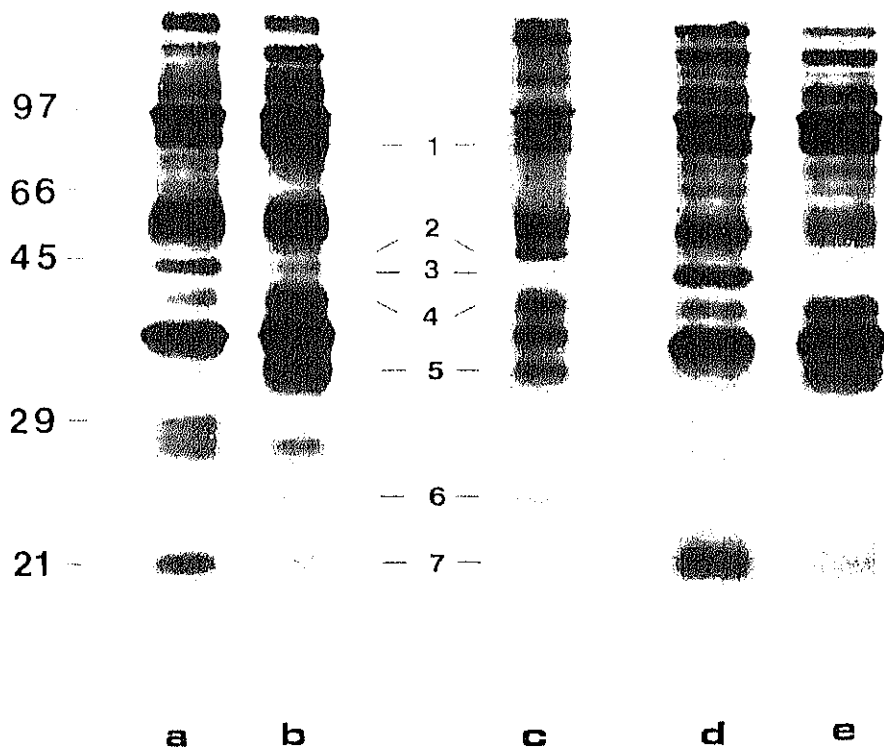


Fig. 5 . Comparación del efecto de la temperatura corporal y la castración sobre la síntesis de proteínas de secreción de la cauda. Las proteínas marcadas secretadas *in vitro* por los explantes de la cauda, se analizaron en SDS-PAGE. a: Cauda control (escrotal); b: Cauda contralateral situada a temperatura corporal (abdominal) 15 días antes; c: Cauda escrotal de conejos castrados 15 días antes; d: Cauda escrotal de conejo castrado tratado 15 días con testosterona; e: Cauda abdominal de animal tratado 15 días con testosterona. A la derecha aparece el peso molecular (en KDa) de los marcadores utilizados. Las diferentes proteínas reguladas se encuentran numeradas en el centro de la figura.

completo de la EP21, así como de otro componente de unos 150 KDa. Curiosamente, la deprivación de andrógenos lleva consigo la aparición de un polipéptido de 24 KDa y la intensificación de varias bandas comprendidas entre 32 y 90 KDa. La administración de testosterona a los animales castrados revirtió el patrón electroforético hacia el observado en animales intactos, con la excepción de algunos polipéptidos de peso molecular superior a 100 KDa, cuyas bandas aparecieron más intensas (Fig. 5). Los cambios mencionados en este apartado se obtuvieron de forma repetida para los diferentes pares de animales utilizados en estos estudios.

#### **1.4. Regulación por el desarrollo**

Se ha estudiado igualmente la influencia de la edad sobre el patrón de proteínas sintetizadas por el epidídimo. Para ello, se analizó el patrón de polipéptidos sintetizados y secretados por el epidídimo de conejos sexualmente inmaduros (Fig. 6), observando su similitud con el de animales adultos, salvo en el aspecto cuantitativo, donde difieren considerablemente. Los polipéptidos de 21 y 35 KDa están presentes en pequeñas cantidades, mientras que las bandas correspondientes a los péptidos de 32 y 42 KDa se encuentran incrementadas. Si se comparan los patrones proteicos correspondientes a animales castrados e inmaduros, se puede observar una importante analogía.

#### **1.5. Regulación por temperatura**

En la Figura 5 se muestra el efecto de la temperatura corporal sobre la síntesis de proteínas de secreción de la cauda. Los polipéptidos sintetizados en las caudas controles (Fig. 5) abarcan un amplio rango de peso molecular, como se describe en el apartado 1.1 de este capítulo. La cauda contralateral mantenida a temperatura corporal ofreció un patrón proteico con algunas diferencias con respecto al anterior (Fig. 5). Concretamente, la síntesis de las proteínas 1, 4 y 5 se encuentra incrementada, observando curiosamente la aparición de un nuevo polipéptido (6). Por otro lado, se detecta una disminución en la síntesis de los polipéptidos 3 y 7. Estos cambios son muy similares a los producidos por causa de la castración (Fig. 5), aunque en este caso se incrementa además la síntesis de otro polipéptido (2).

En vista de los cambios similares producidos por la castración y la elevación de la temperatura sobre la síntesis de proteínas de secreción de la cauda, nos planteamos la posibilidad de que un

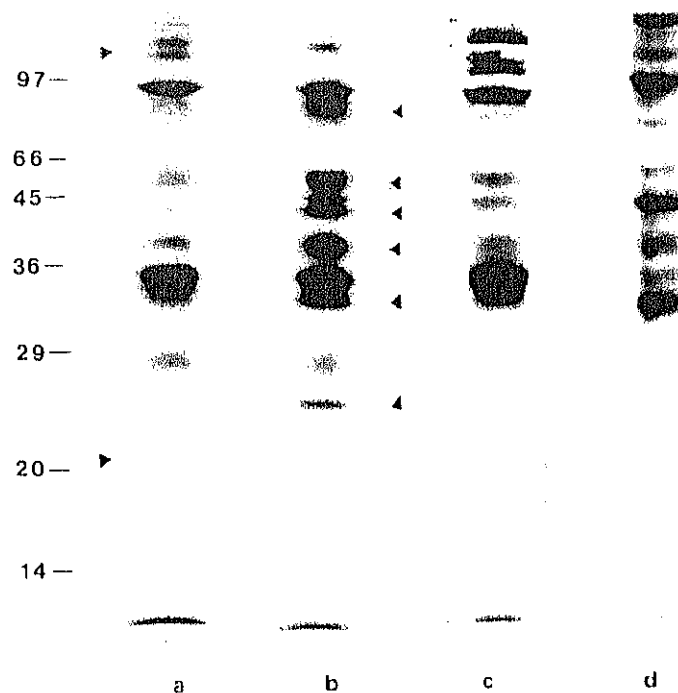


Fig. 6 . Regulación hormonal y por el desarrollo de proteínas de secreción epididimales. Unas 30.000 cpm de proteínas marcadas secretadas *in vitro* por explantes se analizaron por SDS-PAGE. Los explantes procedían de los siguientes animales: a: Conejos controles; b: Animales castrados 15 días antes; c: Igual que en el carril b, salvo que los animales recibieron un aporte de testosterona como se indica en "Materiales y Métodos". Las puntas de flecha a la izquierda de los polipéptidos indican los inducidos por andrógenos; las situadas a la derecha se refieren a los reprimidos por andrógenos; d: Polipéptidos marcados secretados por explantes epididimales de animales inmaduros (de 1 mes). Los números indican los pesos moleculares (en kDa) de los marcadores utilizados.

aporte exógeno de andrógenos (suplemento a la producción testicular) pudiera revertir los efectos de la temperatura. La Figura 5 muestra que tal administración de andrógenos no contraresta los efectos de la temperatura, salvo para el polipéptido 6, cuya síntesis se encuentra reprimida como ocurre en la cauda control.

### **1.6. Traducción de poli (A)+RNA en sistemas libres de células**

Con el fin de profundizar en los mecanismos responsables de las observaciones descritas en el apartado anterior, se analizaron los niveles del mRNA correspondiente a la EP21, uno de los péptidos regulados por andrógenos y temperatura, y del que se disponían anticuerpos específicos.

De forma preliminar, se establecieron las condiciones para una traducción adecuada del poli (A)+RNA (Fig. 7). La síntesis de proteínas totales se mostró lineal y dependiente de la dosis hasta una concentración de RNA de 10  $\mu$ g/ml, para descender gradualmente a partir de este punto. La síntesis de la EP21, medida por ensayos de inmunoprecipitación, describió una cinética más lineal, originando un porcentaje constante de producto inmunoprecipitable para bajas concentraciones de RNA y aumentando el porcentaje cuando éstas se elevaban (Fig 7, inserto). Esta traducción preferencial para la EP21 es similar a la descrita para otros mRNAs ([Kaempfer, 1983 #128; Lombardero, 1981 #127]) y parece deberse a un proceso de iniciación preferencial en el ribosoma. Considerando estos resultados, las traducciones subsiguientes de RNA se realizaron utilizando dosis de RNA situadas en la zona de respuesta lineal. Se realizaron ensayos de traducción utilizando poli (A)+RNA proveniente de caudas escrotales y abdominales, así como de animales castrados. Los productos totales e inmunoprecipitables se analizaron mediante SDS-PAGE. Los productos totales (Fig. 8) no variaron de manera significativa en cualquiera de los casos. La incorporación de [<sup>35</sup>S]metionina en productos totales, expresada en c.p.m. por  $\mu$ g de RNA, fue de 27.000  $\pm$  3.200, 30.000  $\pm$  3.800 y 32.000  $\pm$  4.200 ( $\pm$ SD, n=3) para caudas de animales castrados, situadas a nivel abdominal y a nivel escrotal, respectivamente.

Cuando se analizaron por SDS-PAGE los productos inmunoprecipitados de las traducciones anteriores, se observaron cambios de importancia (Fig. 8). Los niveles de EP21 mRNA en animales castrados bajaban casi por completo, restaurándose como consecuencia del tratamiento con testosterona. De manera similar, la concentración del mRNA de la EP21 se redujo fuertemente en

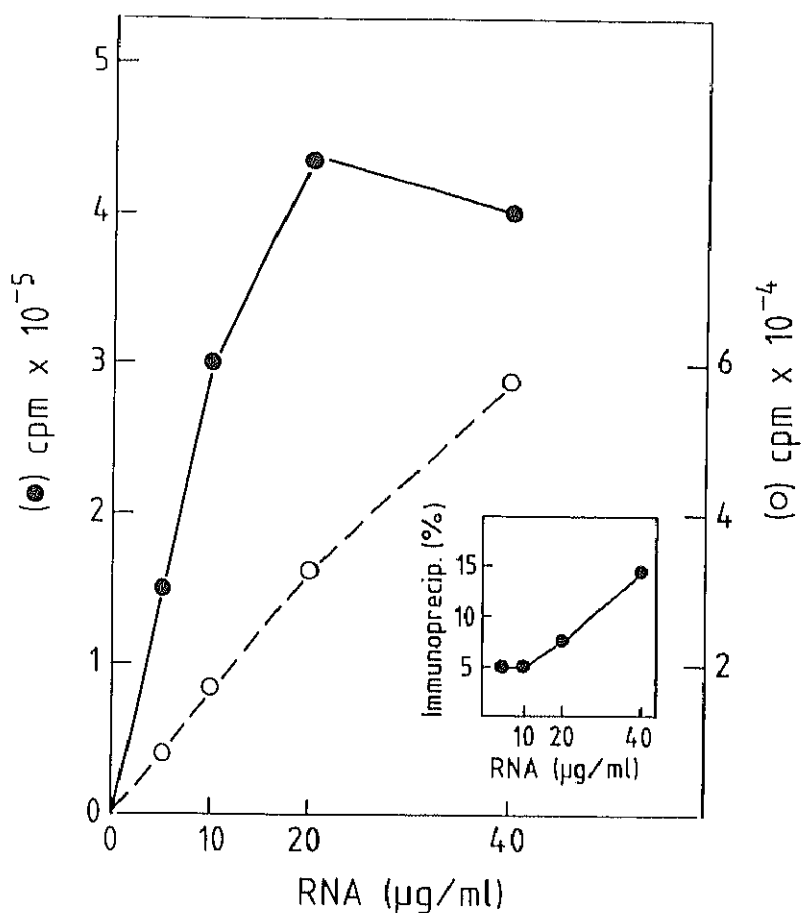


Fig. 7. Traducción en un sistema libre de células de poli (A<sup>+</sup>)RNA procedente de cauda. La síntesis de proteínas se llevó a cabo en un lisado de reticulocitos con las concentraciones de RNA indicadas. Seguidamente, se determinaron la síntesis de proteínas totales (●) y el producto inmunoprecipitado de la EP21 (○). El diagrama interno muestra el porcentaje de productos inmunoprecipitables sintetizados utilizando diferentes concentraciones de RNA.

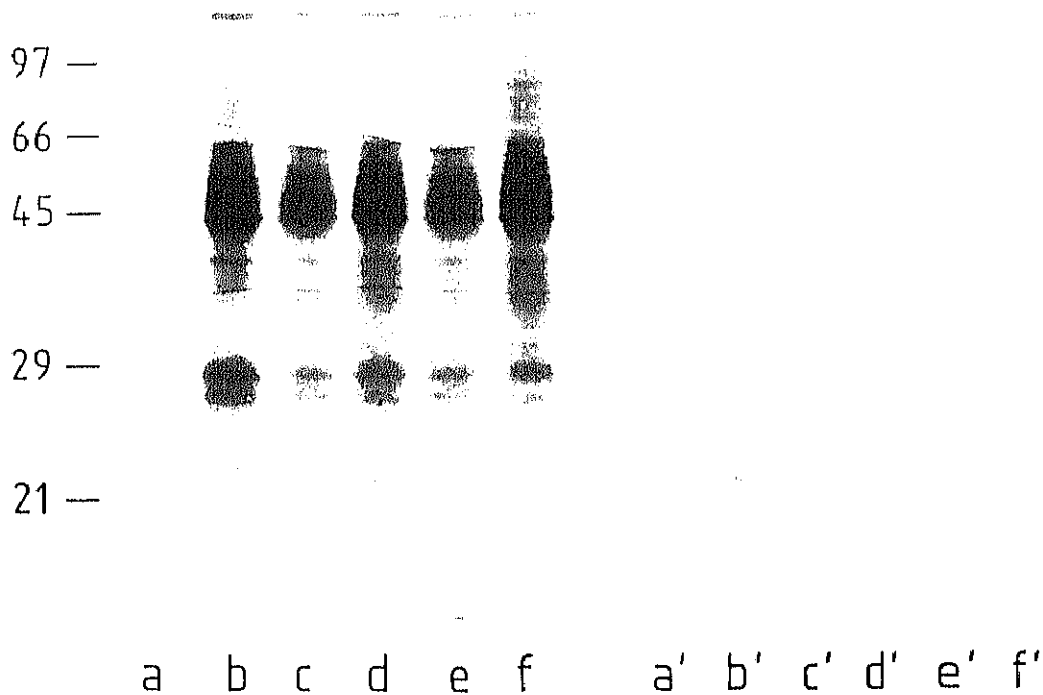


Fig. 8 .: Efecto de la temperatura corporal y la castración sobre los productos totales (A) y los inmunoprecipitables con anti-EP21 (B) sintetizados en el lisado de reticulocitos. Se tradujeron 8  $\mu$ g de poli(A<sup>+</sup>)RNA de cauda epididimal en el lisado. Los productos del ensayo se analizaron mediante SDS-PAGE directamente (A) o después de inmunoprecipitar con el anticuerpo frente a la EP21. Los carriles a y a' representan ensayos en blanco realizados en ausencia de RNA. La procedencia del poli(A<sup>+</sup>)RNA en los diferentes carriles es la siguiente: cauda control escrotal (b, b'); cauda escrotal de animales castrados (c, c'); como en el caso anterior más un aporte de testosterona durante 15 días (d, d'); cauda abdominal (e, e'); como en el caso anterior más un aporte de testosterona durante 15 días (f, f'). En la parte izquierda se indica el peso molecular (KDa) de los marcadores. Las puntas de flecha indican la posición de los productos inmunoreactivos frente a la EP21.

caudas abdominales, comparando con aquellas que habían sido mantenidas en su posición natural, aunque en este caso el aporte de andrógenos no restauró las concentraciones del mRNA de la EP21.

Debe resaltarse que en cualquiera de los casos el mensajero de la EP21 dirigió la síntesis de un polipéptido de 23 KDa de peso molecular, por lo tanto de peso molecular superior al de la EP21 madura, hecho esperable sin embargo, puesto que los productos primarios de traducción de proteínas de secreción contienen un fragmento adicional de unos 20 aminoácidos denominado "péptido señal" ([Kreil, 1981 #129]).

### **1.7. Cuantificación del receptor de andrógenos en el epidídimo**

Puesto que los andrógenos, al igual que otras hormonas esteroideas, median sus principales acciones por interacción con receptores específicos ([Yamamoto, 1985 #130]), un descenso en estos receptores androgénicos, producido por la elevación térmica, podría explicar los efectos análogos obtenidos tras sendos períodos de castración y aumento de temperatura. Con el fin de aclarar este punto, se midieron los niveles del receptor de andrógenos en caudas controles y situadas a nivel abdominal. Los resultados obtenidos fueron similares en ambas situaciones ( $3 \pm 0.4$  fmol/mg para los controles y  $2.8 \pm 0.5$  fmol/mg de proteína tisular soluble para los epidídimos subidos al abdomen;  $n=3$ ). Estos resultados parecen indicar que los efectos originados por elevación de la temperatura no son consecuencia de mecanismos que alteren la presencia de los receptores androgénicos.

## **2. CARACTERIZACION DE PROTEINAS DEL FLUIDO EPIDIDIMAL**

### **2.1. Purificación de isoformas de 21 KDa que ligan ácido retinoico**

Puesto que hasta el momento conocíamos que la denominada por nosotros EP21 era una proteína regulada androgénica y térmicamente con capacidad de unión a la membrana del espermatozoide, decidimos proceder a su purificación para profundizar en el estudio de la misma. Así mismo, otro punto importante que nos empujó a esta caracterización, fue la existencia de una proteína en el epidídimo de rata regulada por andrógenos



([Brooks, 1986 #9]) y un peso molecular próximo al de la EP21 (18.5 KDa) y que tiene capacidad de unión a ácido retinoico ([Newcomer, 1990 #113]).

El fluido epididimal se incubó a 0°C con [<sup>3</sup>H] ácido retinoico y se cromatografió en una columna de Sephadex G-100 en cuyas fracciones se midieron radiactividad y A<sub>280</sub> (Fig. 9). Se observaron tres picos de radiactividad asociados a otros tres principales picos de proteínas. El pico I corresponde al volumen de exclusión (V<sub>0</sub>) y resultó heterogéneo en SDS-PAGE (Fig. 9, inserto). El pico II también era heterogéneo, con un componente mayoritario de seroalbúmina. La presencia de esta proteína podría explicar la unión de retinoico observada en este pico puesto que la seroalbúmina liga este compuesto ([Chytil, 1978 #148]).

El pico III (EP21) es aparentemente bastante homogéneo en SDS-PAGE pero resultó heterogéneo en PAGE en condiciones no desnaturizantes (Fig. 10) sugiriendo la presencia de diferentes componentes con la misma M<sub>r</sub>.

Las fracciones correspondientes a este pico se sometieron a cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa (Fig. 10). Se observaron tres picos de radiactividad asociados a otros correspondientes de proteínas. El pico I es material no retenido en la columna y es todavía heterogéneo (Fig. 10). Los picos II y III parecen homogéneos tanto en condiciones desnaturizantes o no. El componente III eluye a mayor fuerza iónica en la columna, sugiriendo mayor carga negativa que el II. En concordancia con esto, el pico III se mueve más rápidamente que el II en la electroforesis no desnaturizante realizada a pH básico. Para determinar la posible saturabilidad de unión del retinoico a la EP21, alícuotas de fluido epididimal se incubaron con [<sup>3</sup>H]ácido retinoico y cantidades crecientes de ácido retinoico no marcado (hasta 2 x 10<sup>-5</sup> M), cromatografiándose entonces en Sephadex G-100. Este tipo de experimentos demostró que la unión de retinoico a EP21 no era saturable. Con similares técnicas se observó que EP21 no liga [<sup>3</sup>H]retinol.

Por otro lado, para demostrar que la radiactividad asociada a EP21 era auténtico ácido retinoico y no un metabolito producido en la incubación con el fluido epididimal, la EP21 se extrajo con etanol y estos extractos se analizaron en cromatografía de capa fina junto con un patrón de retinoico. Los resultados demostraron que la radiactividad ligada a EP21 era auténtico ácido retinoico.

## 2.2.- Caracterización de las isoformas II y III

### 2.2.1.- Determinación de M<sub>r</sub>

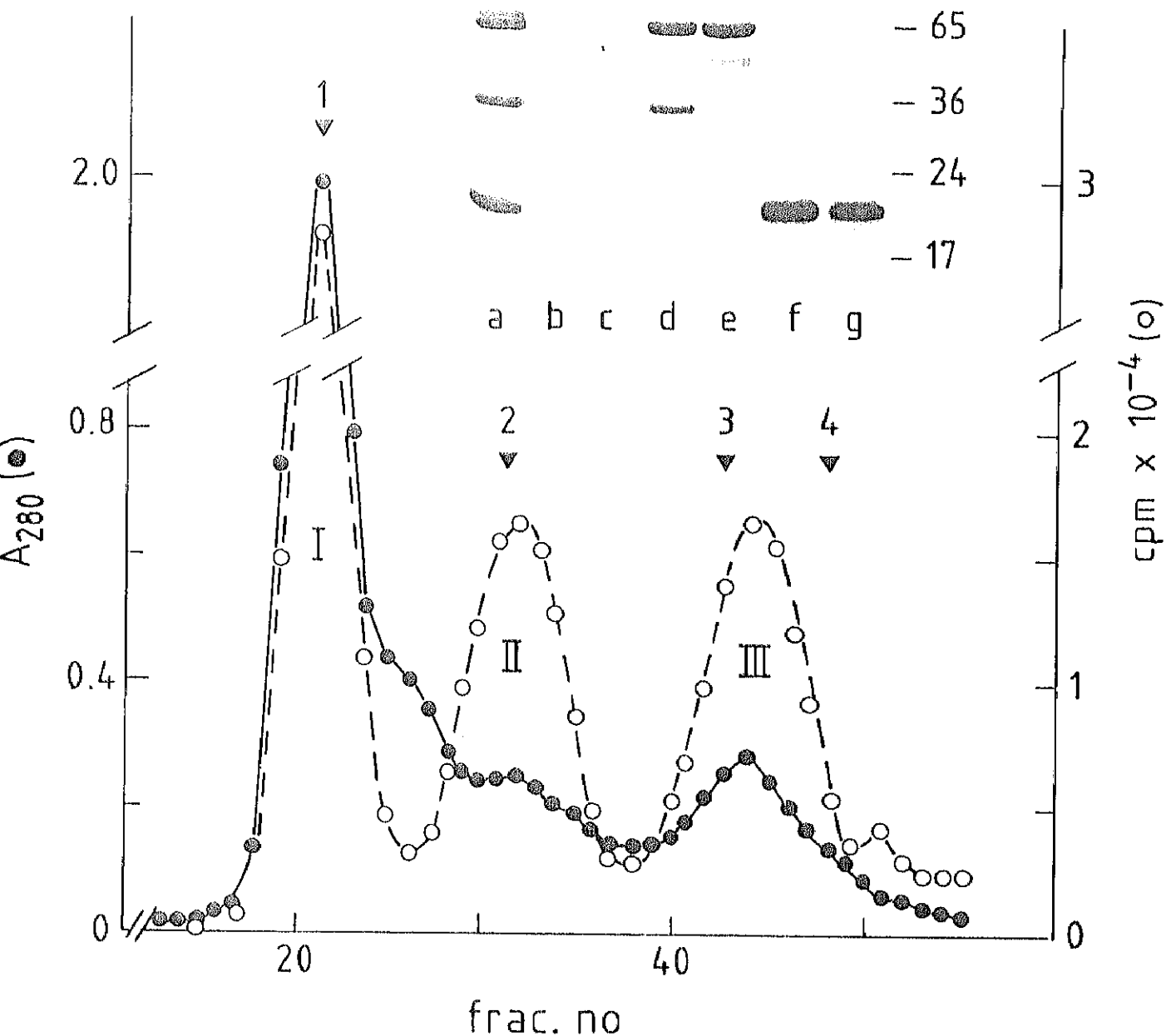


Fig. 9 . Cromatografía en Sephadex G-100 de fluido epididimal incubado con  $[^{31}I]$ ácido retinoico. Las puntas de flecha indican las posiciones de elución de los siguientes marcadores: 1)  $\beta$  amilasa (200 KDa) ( $V_0$ ); 2) BSA (65 KDa); 3) quimotripsinógeno (25 KDa); 4) uteroglobina (15 KDa). La fotografía interior muestra el análisis mediante SDS-PAGE del contenido de las siguientes fracciones: 19 (b); 24 (c); 28 (d); 34 (e); 42 (f); 46 (g). El carril a contiene fluido epididimal inicial aplicado a la columna. La  $M_r$  de los marcadores (en KDa) está indicada a la derecha de la fotografía.

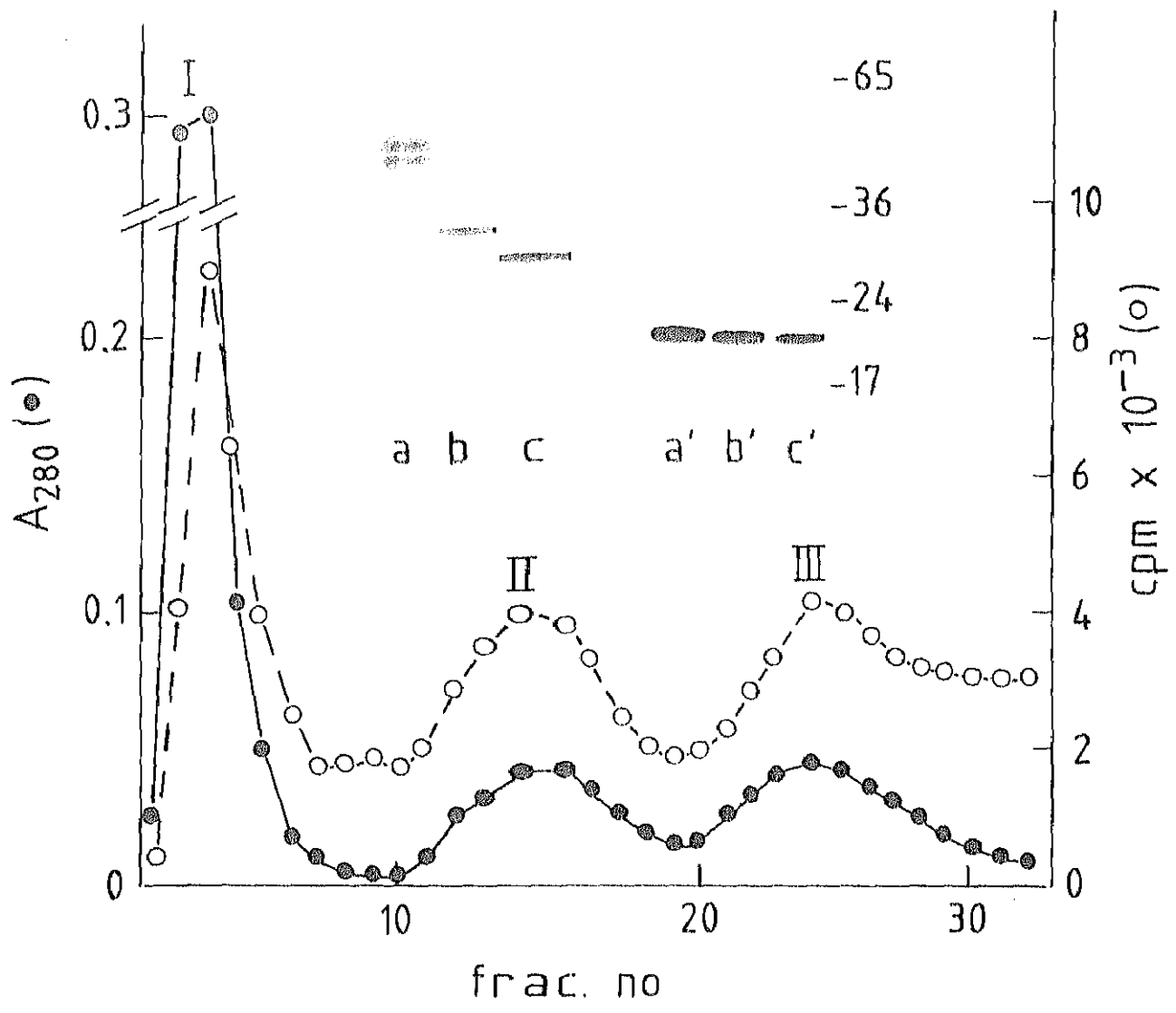


Fig. 10 . Cromatografía de intercambio iónico del pico III obtenido en Sephadex G-100. El pico III (EP21) se aplicó a una columna de DEAE-celulosa que se desarrolló con un gradiente de NaCl como se indica en Métodos. La proteína ( $A_{280}$ ) y la radioactividad asociada a ella se determinaron en cada fracción. La fotografía interna muestra el análisis de cada pico mediante PAGE en condiciones nativas (izquierda) o desnaturalizantes (derecha). Los carriles contienen: pico I (a, a'); pico II (b, b'); pico III (c, c'). La  $M_r$  de los marcadores usados en SDS-PAGE está indicada como en la Fig. .

Los picos II y III tienen la misma  $M_r$  (21 KDa) tanto en determinaciones en filtración en gel como en SDS-PAGE (Fig. 11). La coincidencia de  $M_r$  en los dos sistemas indica que a pH 7 y 0.15 M NaCl los polipéptidos II y III están como monómeros.

### 2.2.2.- *Análisis de aminoácidos y azúcares. Secuenciación*

El análisis de aminoácidos de las dos EP21 (II y III) sugiere una composición muy similar (Tabla 2). Ambos polipéptidos se tiñeron con el reactivo de Schiff, sugiriendo que son glicoproteínas. La secuenciación del componente II intacto permitió identificar los siguientes residuos:  $H_2N$ -Ala-Gly-Ala-X-Asp-Pro-Gly-Val. El componente III no generó ninguna secuencia, sugiriendo un N-terminal bloqueado.

### 2.2.3.- *Mapas peptídicos*

Los péptidos trípticos de los componentes II y III, separados por HPLC, se muestran en la Figura 12. Ambos polipéptidos tienen péptidos muy similares variando sólo 1 o 2 de ellos.

Los mapas peptídicos de los péptidos trípticos dansilados se muestran esquemáticamente en la Figura 13. También con este sistema de análisis se observa una gran homología entre EP21 II y III, pero al menos un péptido parece diferente.

## 2.3.- **Actividad antiproteasa en el fluido epididimal**

### 2.3.1.- *Actividad antiproteasa a lo largo del proceso de purificación.*

Una observación totalmente fortuita llevó a la detección de una actividad antiproteasa que parecía asociada a EP21. Para clarificar este punto se hizo un seguimiento de esta actividad en cada uno de los pasos de purificación de esta proteína(s) comentados en 2.1.

En Sephadex G-100 (Fig. 14) se observa un pico de actividad antitripsina que no se solapa exactamente con el pico de EP21, eluyendo con una  $M_r$  aparente de ~25 KDa. Cuando este pico de antiproteasa se cromatografió en DEAE-celulosa, la actividad eluyó en la fracción no unida a la columna y que como se mostró en 2.1 (Fig. 10) es heterogénea. Las isoformas EP21 II y III no poseían actividad antiproteasa. Debido a su heterogeneidad el polipéptido activo todavía no ha sido purificado totalmente.

Puesto que el testículo y el torrente circulatorio son fuentes importantes del material proteico que constituye el fluido

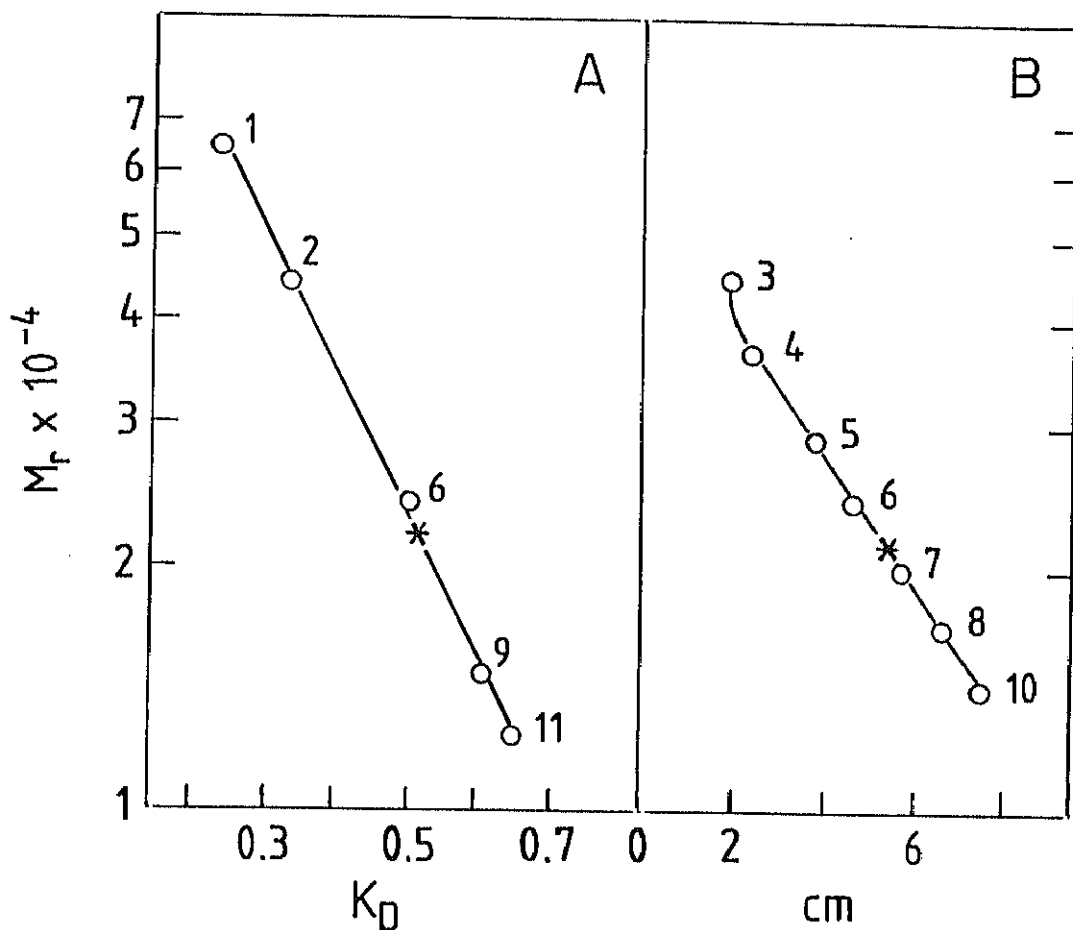


Fig. 11. Determinación de las  $M_r$  aparentes de las isoformas II y III en condiciones nativas (A) y desnaturalizantes (B). Ambas isoformas se cromatografiaron en Sephadex G-100 (A) o se analizaron en SDS-PAGE en geles del 12.5% (B). La posición de elución (o movilidad) de las dos isoformas se interpoló en las rectas de calibración obtenidas con los siguientes marcadores: 1) SAB; 2) ovoalbúmina; 3) gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa; 4) anhidrasa carbónica; 5) quimotripsinógeno; 6) inhibidor tripsina de soja; 7) mioglobina; 8) uteroglobina; 9) Isozima; 10) citocromo C.  $K_D = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$

Composición de aminoácidos de EP21 II y III				
	mol/100mol		nº probable de residuos	
	II	III	II	III
Asp	7.43	6.72	14	13
Tre	5.80	5.65	11	11
Ser	5.15	6.15	10	11-12
Glu	13.40	13.18	25	25
Pro	0.31	0.22	1	1
Gli	3.80	4.00	7	7
Ala	16.23	17.60	31	33
Val	8.24	8.13	15-16	15-16
Met	2.22	1.98	4	4
Ile	1.74	1.71	3	3
Leu	9.30	9.15	17-18	17-18
Tir	5.10	5.90	10	11
Fen	4.90	4.46	9	9
Lis	8.63	7.80	16	15
His	3.20	3.10	6	6
Arg	4.64	4.00	9	8
Residuos totales			188/190	189/192

Tabla 2. Composición de aminoácidos de EP21 II y III

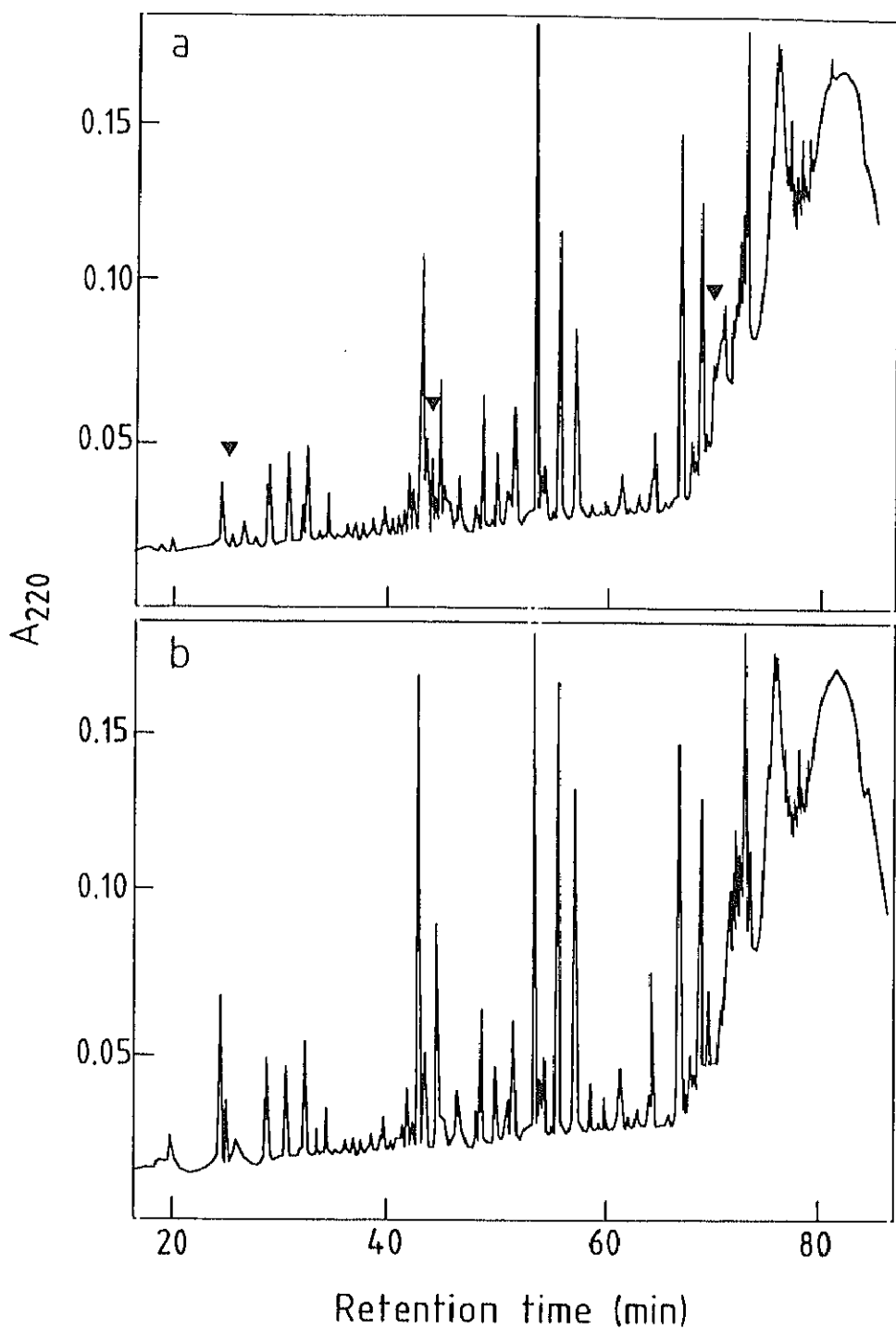


Fig. 12. Mapas peptídicos de las isoformas II (a) y III (b) de la EP21. Ambas isoformas se digirieron con tripsina y los péptidos se separaron mediante cromatografía (HPLC) en fase reversa. Las puntas de flecha indican posibles diferencias en el patrón de péptidos

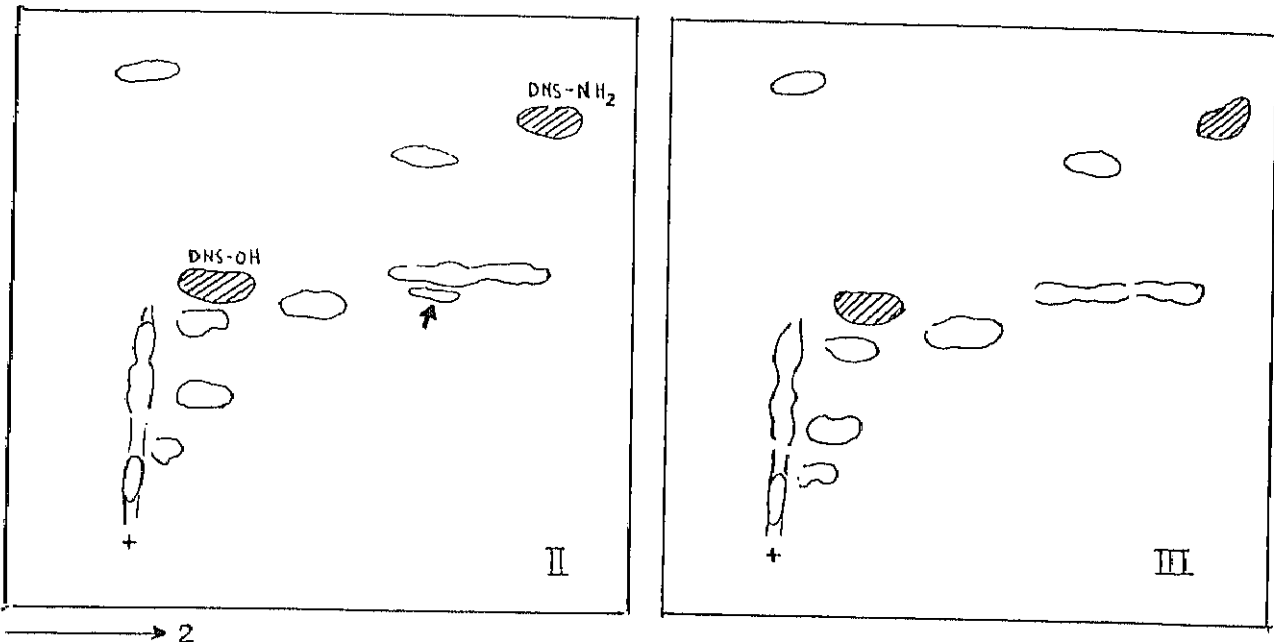


Fig. 13. Mapas peptídicos de las isoformas II y III de EP21. Los péptidos trípticos de ambas proteínas se "dansilaron" y se separaron en cromatografía bidimensional en capa fina como se describe en Métodos. Los péptidos fluorescentes se visualizaron con luz UV. Los subproductos del reactivo (DNS-OH y DNS-NH<sub>2</sub>) se muestran rayados. La flecha en II apunta a un péptido con diferente movilidad.



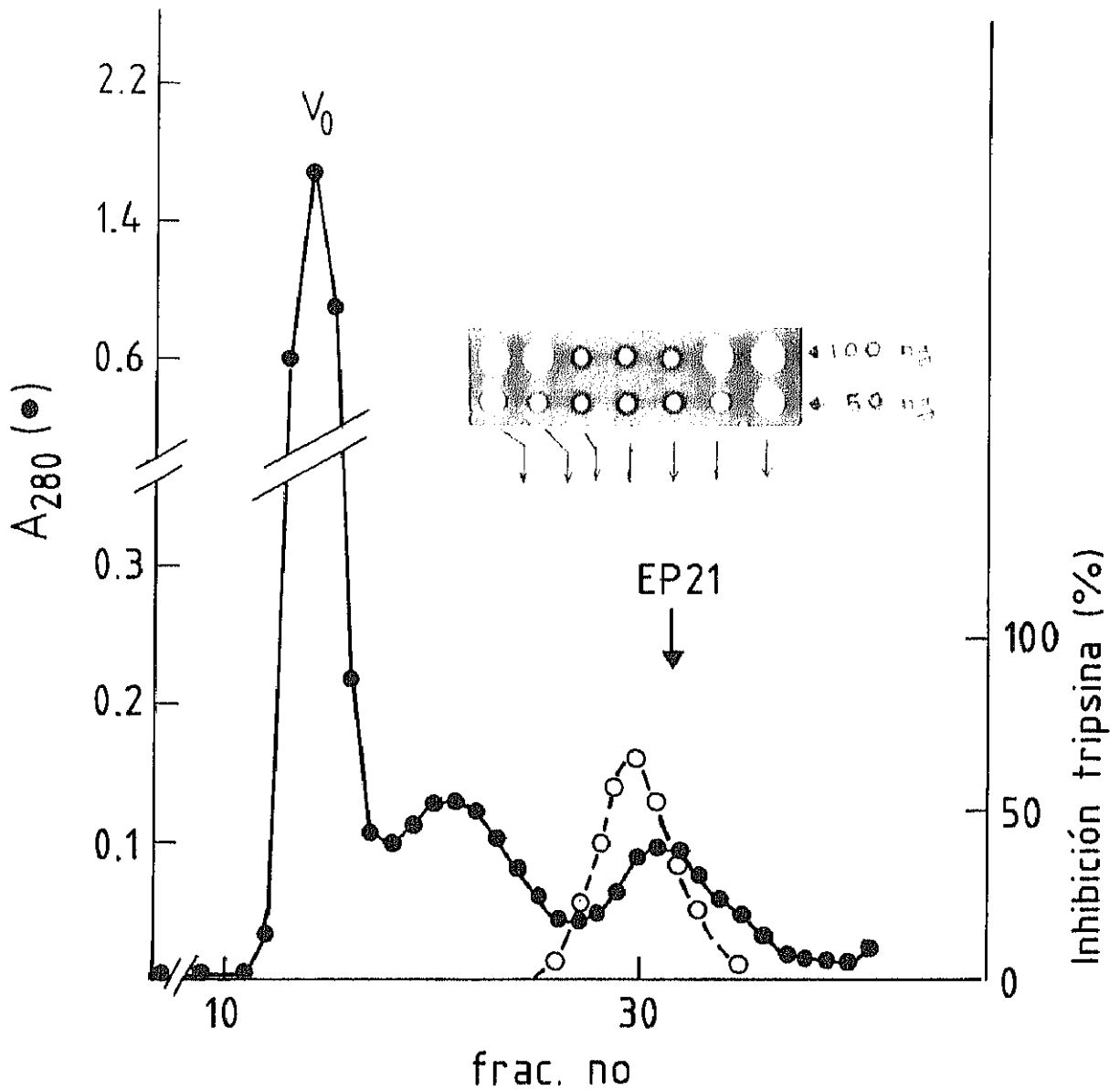


Fig. 14 . Purificación en Sephadex G-100 del inhibidor de proteasas epididimal. Fluído epididimal de conejo se cromatografió en una columna en las mismas condiciones como en la Fig. . 10  $\mu$ l de cada fracción se usaron para determinación de inhibición de tripsina, bien con azocaseína (○---○) o por el método de difusión radial (fotografía inserta). En este último caso se emplearon dos dosis de tripsina (50 y 100 ng).

epididimal, el siguiente punto a esclarecer era la procedencia de la actividad antiproteasa encontrada. Para ello, se corrieron sendas cromatografías de filtración de un extracto testicular y de suero de conejo concentrado tres veces, en las mismas condiciones a las utilizadas para el fluido epididimal. Se determinó la actividad antiproteasa en un rango de fracciones donde debería eluirse el inhibidor encontrado en fluido epididimal, obteniendo resultados negativos para suero (Fig. 15) y un pico de actividad para el extracto testicular, aunque de peso molecular superior al inhibidor epididimal (Fig. 16). A la vista de estos resultados, parece que el inhibidor es de procedencia epididimal

### *2.3.2.- Regulación androgénica del inhibidor epididimal de proteasas*

Puesto que uno de los principales objetivos del presente trabajo consiste en el estudio de la regulación androgénica de proteínas epididimales, se procedió a determinar si el inhibidor específico de epidídimo estaba sometido a la acción de hormonas androgénicas. Se obtuvieron los fluidos epididimales de varios conejos castrados y de varios controles y se fraccionaron en Sephadex G-100. La determinación de la actividad antiproteasa subsiguiente (Fig. 17) indicó la fuerte disminución de la misma en los animales castrados, lo que nos hace pensar que se trate de un inhibidor regulado por andrógenos.

### *2.3.3.- Especificidad de la actividad antiproteasa*

#### *2.3.3.1.- Frente a proteasas convencionales*

Con el propósito de analizar la especificidad del inhibidor encontrado en epidídimo, se midió la actividad inhibidora frente a proteasas convencionales. Las curvas de inhibición obtenidas muestran una máxima actividad frente a tripsina y papaína, decreciendo notablemente para subtilisina y siendo totalmente inactiva frente a quimotripsina (Fig 18).

#### *2.3.3.2.- Frente a proteasas del espermatozoide*

Dado que existen algunos antecedentes de inhibidores acrosomales encontrados en el plasma seminal y fluido testicular ([Goodpasture, 1981 #106, Tschesche, 1974 #134]), nos planteamos estudiar la posible acción antiproteolítica del inhibidor epididimal sobre la acrosina, el enzima proteolítico presente en el acrosoma del espermatozoide y que parece implicada en la fecundación ([Tesarik, 1990 #149]). Para la purificación del extracto de proacrosina, forma

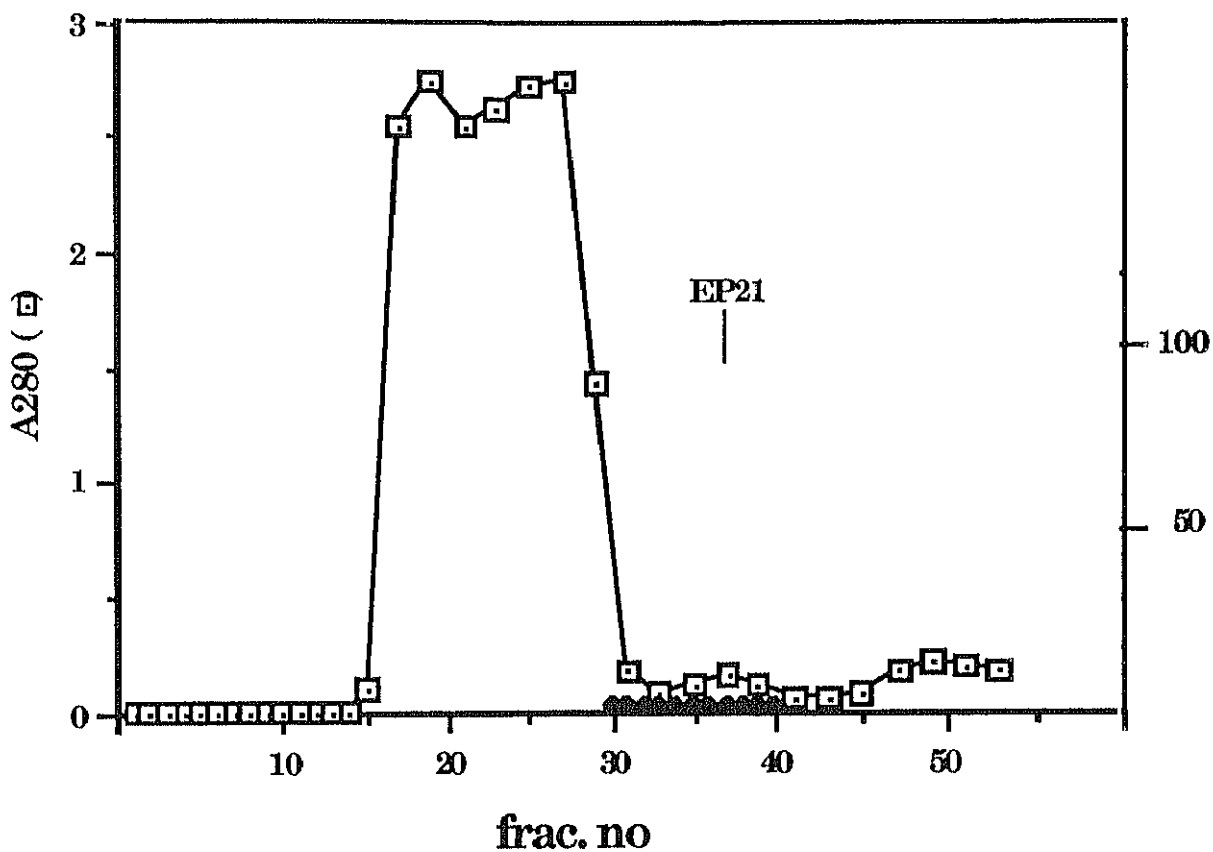


Fig. 15 . Ausencia de inhibidor de proteasas epididimal en suero. Suero de conejo se concentró como se describe en Métodos y se cromatografió en Sephadex G-100 en la mismas condiciones que en la Fig. . La actividad antitripsina (●) se midió en las fracciones. No se observa actividad en la posición de elución del inhibidor epididimal.

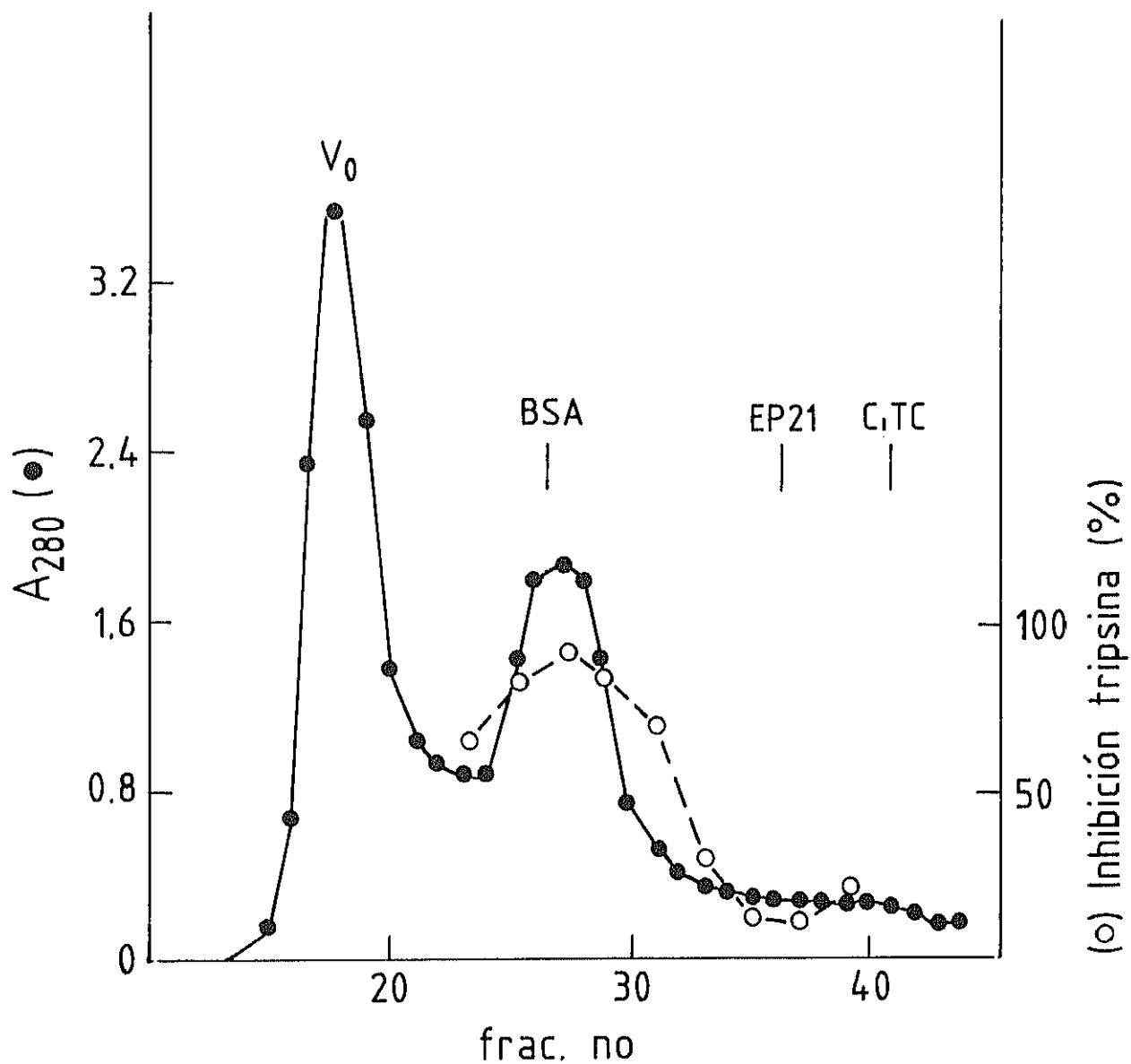


Fig. 16. Ausencia de inhibidor de proteasas epididimal en la secreción del testículo. Un testículo de conejo se dividió en explantes que se incubaron en 7 ml de medio de cultivo durante 5 h como se describe en Métodos. El medio se centrifugó, se concentró por liofilización y se cromatografió en Sephadex G-100 en la mismas condiciones que la Fig.14. La actividad antitripsina (○--○) se midió en las fracciones. No se observa actividad en la posición de elución del inhibidor epididimal.

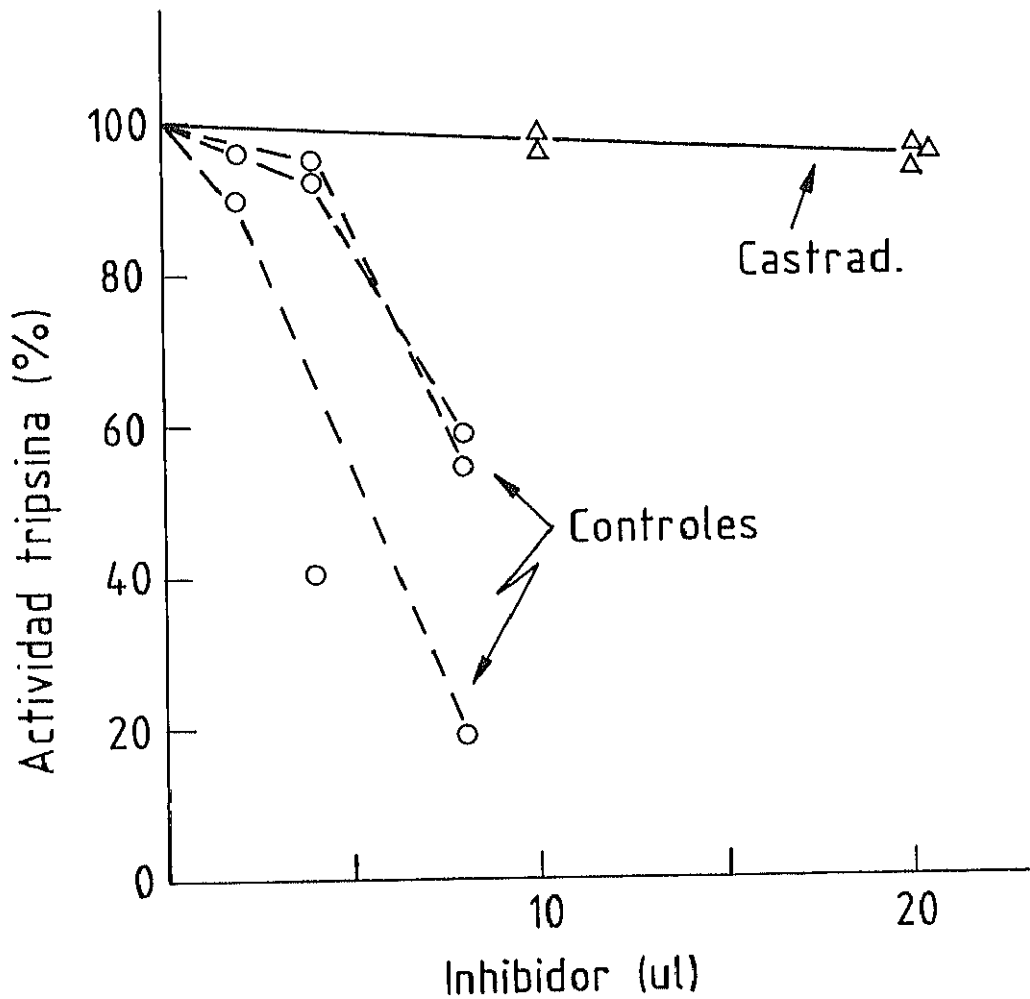


Fig. 17. Desaparición del inhibidor epididimal en animales castrados. Fluído epididimal de animales controles intactos o de castrados 15 días antes, se cromatógrafió en Sephadex G-100, se reunieron las fracciones correspondientes al inhibidor y se ensayó la actividad frente a tripsina (80 ng). Cada curva corresponde a un animal diferente.

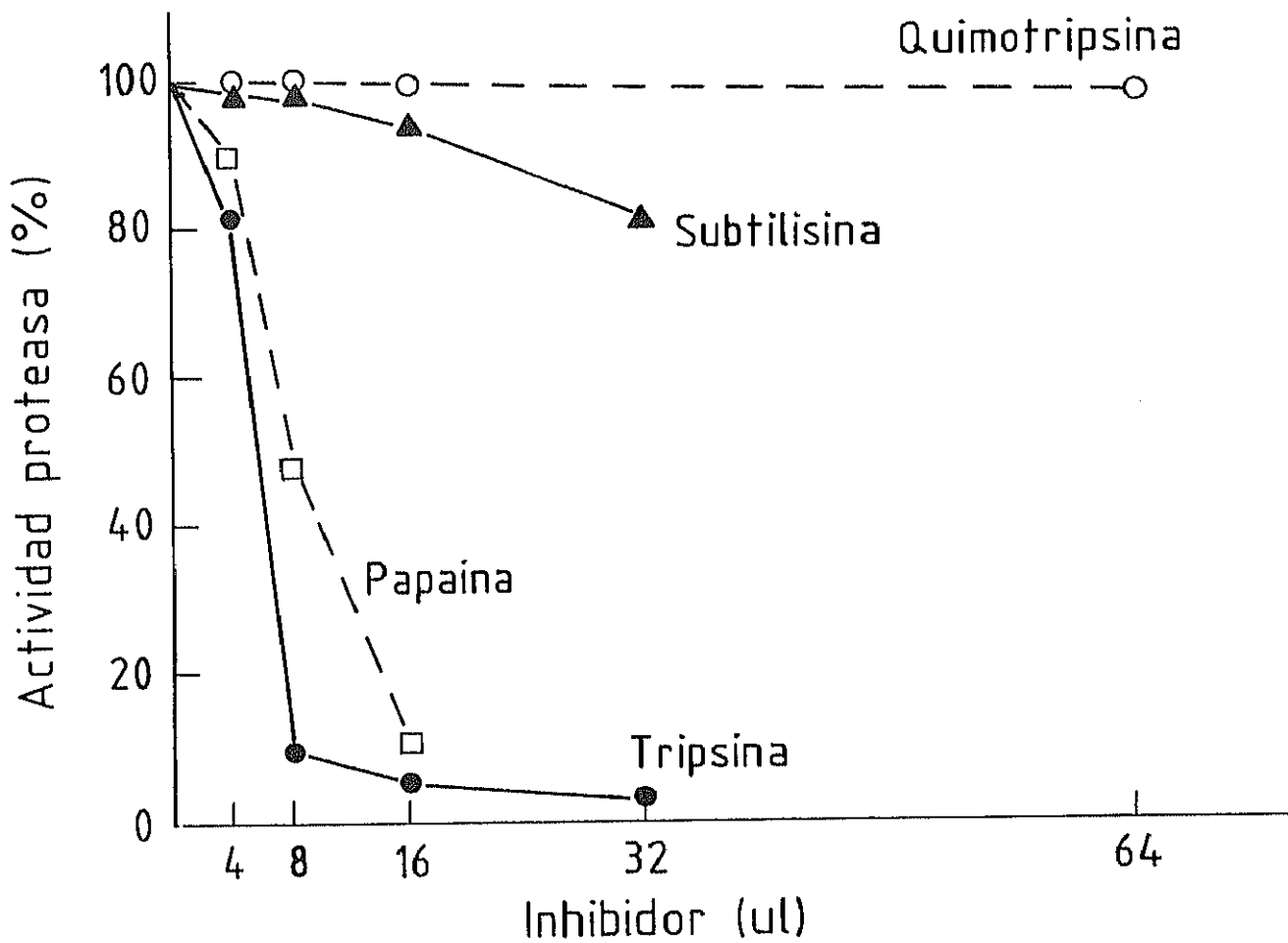


Fig. 18. Inhibición de diferentes proteasas por el inhibidor epididimal. La actividad de 80 ng de cada proteasasa se determinó en presencia de las cantidades de inhibidor indicadas. El ensayo se realizó usando como substrato azocaseína, como se describe en Métodos.

precursora inactiva de la acrosina, se siguió el esquema mostrado en "Materiales y Métodos", donde el lavado repetido de espermatozoides con PBS se mostró crucial a la hora de eliminar inhibidores de proteasas presentes en la preparación. La omisión de este punto puede enmascarar cualquier actividad de acrosina presente en la preparación. Para la medición de la actividad proteolítica de la acrosina, previamente se debe autoactivar la proacrosina, hecho que se consigue a pH básico (pH 8.0) y en presencia de iones  $\text{Ca}^{+2}$ . La purificación de proacrosina se lleva a cabo a pH ácido (pH 3.0) precisamente para evitar en lo posible pérdidas en el precursor. La Figura 19 muestra la actividad de la acrosina después del proceso de activación. Una vez confirmada la presencia en el extracto de actividad en acrosina, se ensayó la capacidad antiacrosina del inhibidor epididimal. Para ello, dado que no se disponía de acrosina purificada a homogeneidad, se utilizaron cantidades de la proteasa que eran capaces de producir un mismo efecto proteolítico que el alcanzado con las concentraciones de tripsina ensayadas. Las curvas de titulación de la acrosina presente en el extracto con el inhibidor epididimal purificado son comparables a las obtenidas para tripsina (Fig. 20).

### **3.- ASOCIACION DE LA EP21 A LA SUPERFICIE DEL ESPERMATOZOIDE**

La unión de varias proteínas del fluido epididimal a la superficie del espermatozoide está ampliamente demostrada ([Brooks, 1980 #37; García, 1988 #77; Zeheb, 1984 #30]). La función de estas proteínas asociadas es oscura hasta el momento. Pareció, por tanto, de interés observar si la EP21 era una proteína asociada al espermatozoide. Para una mejor definición y sensibilidad de detección se emplearon técnicas de inmunomicroscopía electrónica.

#### **3.1.- Caracterización de anticuerpos**

Las proteínas del fluido epididimal fueron separadas en un gel de poliacrilamida con SDS y posteriormente transferidas a papel de nitrocelulosa. Un carril de la inmunotransferencia se tiñó con rojo Ponceau para visualizar el patrón de proteínas (Fig. 21). Se ensayó un carril paralelo de la transferencia con anticuerpos frente a la EP21, obtenidos como se describe en "Métodos". El anticuerpo frente a la EP21 (Fig. 21) mostró especificidad por su antígeno aunque se observó igualmente reacción en zonas de peso molecular inferior, reacción que podría corresponderse con una degradación proteolítica de la EP21, diferentes formas glicosiladas de la proteína

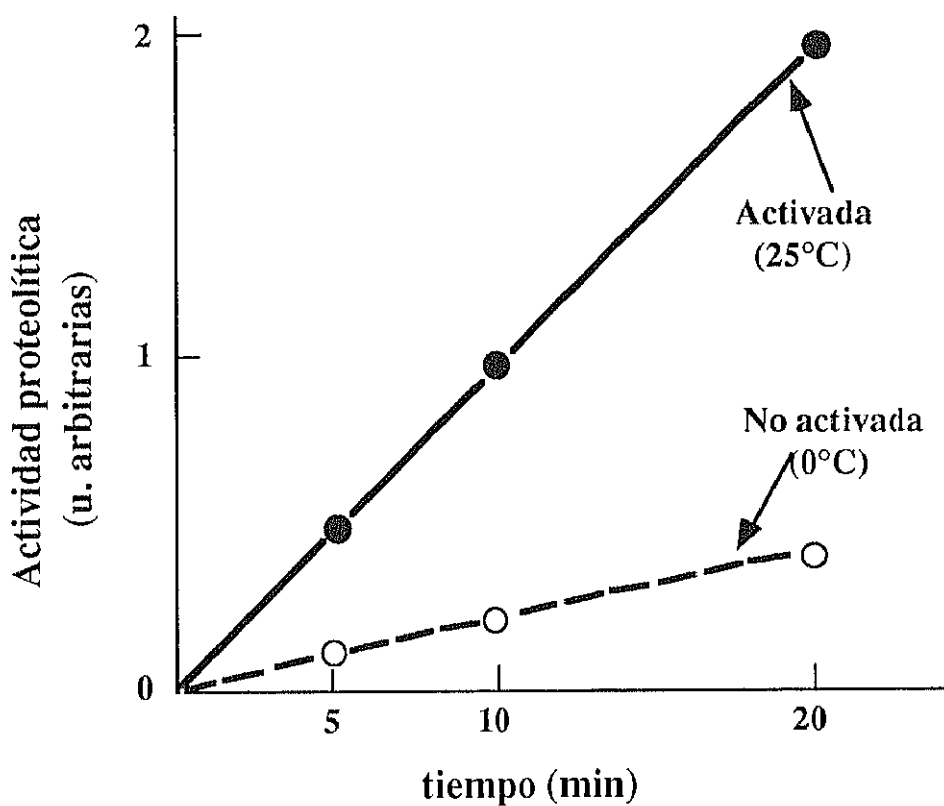


Fig. 19. Activación de proacrosina a acrosina. Proacrosina purificada en Sephadex G-100, se dividió en dos alícuotas. Una de ellas se mantuvo a 0°C durante 1 h mientras que la otra se activó a pH 8 y 10 mM Ca<sup>2+</sup> a 25°C por el mismo tiempo. La actividad proteolítica se determinó siguiendo la cinética de hidrólisis de BAPNA. La ligera actividad de la proacrosina mantenida a 0°C probablemente es debida a activación durante el ensayo de proteólisis.



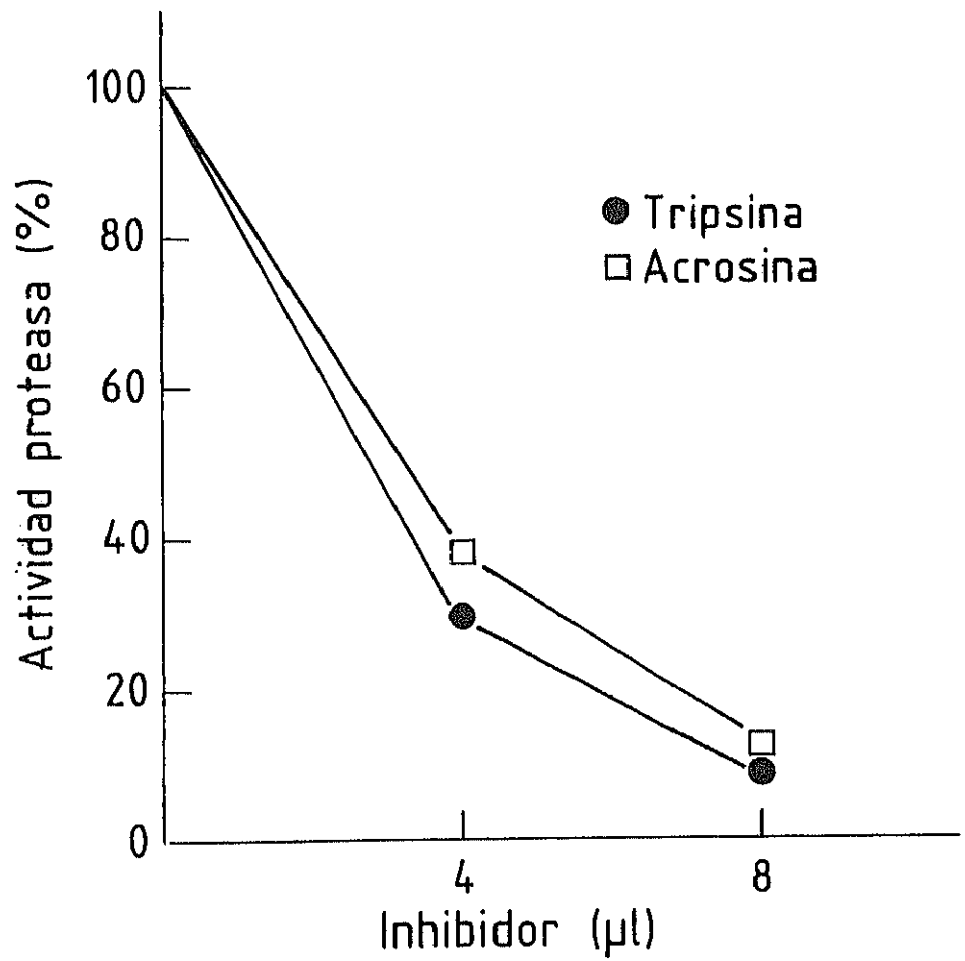


Fig. 20. Efecto comparativo del inhibidor epididimal sobre la actividad de tripsina y acrosina



Fig. 21 . Caracterización del anticuerpo contra EP21. Dos porciones iguales de fluido epididimal se sometieron a SDS-PAGE. El gel se transfirió a papel de nitrocelulosa y un carril (a) se tiñó con rojo Ponceau para visualizar las proteínas totales. El otro carril (b) se incubó con anti-EP21. La  $M_r$  de los marcadores se muestra a la izquierda.

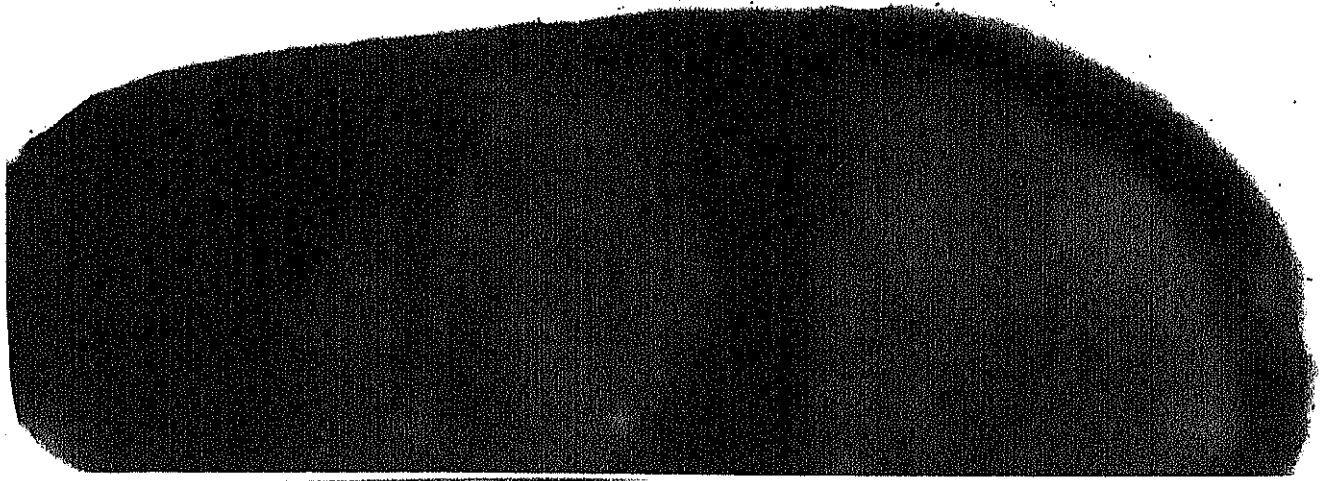
o incluso polipéptidos relacionados con reacción cruzada para el antisuero.

### **3.2.- Inmunomicroscopía electrónica de la EP21 en el espermatozoide**

Los espermatozoides incubados con un suero control no inmune no presentaron reacción ni en la cabeza (Fig. 22) ni en la cola (Fig. 22) Cuando se empleó anti-EP21 para la localización del antígeno correspondiente en la superficie celular, se observó un ligero marcaje en la región acrosomal y en la zona postacrosomal de la cabeza (Fig. 22). La EP21 se asocia igualmente al segmento medio (Fig. 22) pero no a la región principal de la cola (Fig. 22).

Fig. 22. Inmunomicroscopía electrónica de la EP21 en el espermatozoide. **a:** Control incubado con suero no inmune; **b y c:** Segmento medio y región principal, respectivamente, de la cola de un control incubado con suero no inmune; **d:** Asociación de la EP21 a toda la superficie de la cabeza; **e:** Asociación de la EP21 al segmento medio; **f:** No se observa prácticamente ningún marcaje sobre la región principal

a



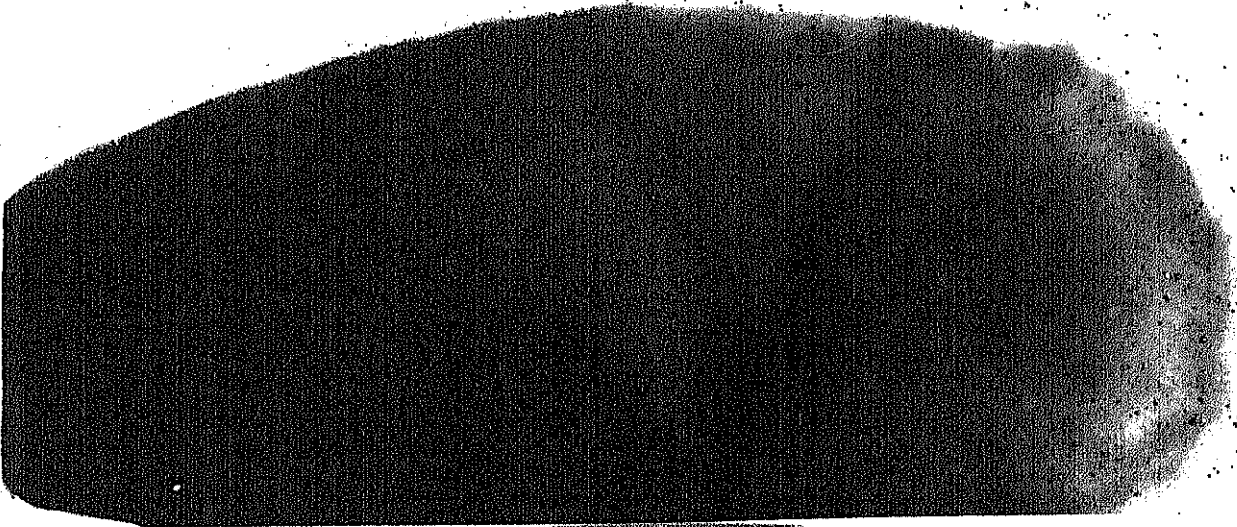
b



c



d



e



f



## DISCUSSION

El epidídimo no es meramente un conducto que comunica físicamente el testículo con las vías inferiores sino que es un órgano donde los espermatozoides maduran, adquiriendo su capacidad de fecundación, y donde se almacenan por largos períodos. Todos estos procesos son dependientes, en primer lugar, de la presencia de andrógenos. Más recientemente, parece que la capacidad de almacenamiento de espermatozoides es además dependiente de una temperatura inferior a la corporal ([Rasweiler, 1982 #137; Bedford, 1978 #60; Esponda, 1986 #8; Bedford, 1991 #7]). En todos estos procesos parecen estar implicadas proteínas de secreción del epidídimo. Así, algunas de estas proteínas son reguladas por andrógenos ([Brooks, 1986 #9; Brooks, 1980 #37; Brooks, 1983 #39; Jones, 1980 #68]) y se asocian diferencialmente a la superficie del espermatozoide ([García, 1988 #77; Olson, 1981 #92; Esponda, 1985 #61]). Aunque existen numerosos estudios sobre el epidídimo y su relación con la maduración del espermio, son relativamente pocos los concernientes con esas proteínas de secreción. Además, la mayoría de estos trabajos han sido realizados en rata, siendo muy pocos los estudios en conejo.

Con estos antecedentes, el presente trabajo ha intentado en primer lugar, la caracterización de proteínas de secreción del epidídimo de conejo y la regulación de su biosíntesis por andrógenos y temperatura. En segundo lugar, se ha intentado purificar alguna de estas proteínas y asignarles una posible función fisiológica.

## **1. BIOSÍNTESIS DE PROTEÍNAS DE SECRECIÓN: REGULACIÓN POR ANDRÓGENOS Y POR TEMPERATURA.**

Los resultados presentados en el presente trabajo, demuestran la utilidad de los explantes epididimales cultivados *in vitro* a la hora de estudiar la biosíntesis de proteínas de secreción en este órgano. En este sistema, aproximadamente un 8-10% de las proteínas sintetizadas por el epidídimo son proteínas de secreción, lo que representa un importante porcentaje, indicativo de la actividad secretora de este órgano.

Un hecho que merece especial atención es la diferencia regional en la síntesis y secreción de algunos polipéptidos de secreción a lo largo del epidídimo de conejo. Este hecho se demuestra igualmente en diferentes trabajos ([Jones, 1980 #68; Orgebin-Crist, 1987 #1; Haro, 1988 #70]), aunque se desconoce si la diferencia regional puede tener un papel fisiológico o simplemente representa el estado de organización celular del epidídimo durante el desarrollo.

El epidídimo es un órgano diana típico de la acción de hormonas androgénicas. La castración provoca involución del epidídimo con un descenso en la síntesis de proteínas específicas ([Jones, 1980 #68; Jones, 1981 #5; Brooks, 1986 #9; Brooks, 1980 #37]). Los resultados aquí mostrados indican que la síntesis y secreción de varios polipéptidos en el epidídimo de conejo son claramente reguladas por andrógenos, haciéndose notar asimismo el efecto dual ejercido por la testosterona sobre estos polipéptidos. La aparición de alguno de ellos depende de la presencia de testosterona, mientras que esta hormona reprime la síntesis de algunos otros. Los conejos inmaduros, es decir, animales con bajos niveles de testosterona, presentan un patrón de síntesis de proteínas de secreción similar en algunos aspectos al encontrado en animales castrados, con algunos polipéptidos cuya síntesis y secreción está reprimida en el adulto. Estos cambios, como se comentará posteriormente, parecen deberse a variaciones en los niveles de mRNA's específicos de proteínas de secreción.

Recientemente Orgebin-Crist *y col* ([Orgebin-Crist, 1987 #1]) analizaron la síntesis de diferentes proteínas del corpus del epidídimo de conejo *in vitro*. En este trabajo también se indica que la testosterona ejerce un efecto dual, aumentando la síntesis de algunas proteínas específicas ( $M_r$  20 y 25 KDa) y reprimiéndola en otros casos ( $M_r$  23, 35 y 42 KDa). Queda por establecer en el estudio mencionado si estas proteínas reguladas hormonalmente son de secreción, aunque es notoria la semejanza de  $M_r$  con los mostrados por nosotros.

Este efecto represivo de la testosterona observado en el epidídimo es de gran interés puesto que puede servir como modelo para un mejor entendimiento de los mecanismos de acción de ésta y otras hormonas esteroides. Generalmente, se ha tendido a estudiar la acción inductora de la testosterona y otras hormonas esteroides sobre determinados genes pero el efecto represor ha recibido mucha menos atención. Recientemente se han descrito en otros órganos proteínas específicas reprimidas por testosterona ([Léger, 1987 #28; Chatterjee, 1987 #66; Saltzman, 1987 #74]) lo que abre una vía interesante para el estudio de la regulación hormonal.

Con los diferentes resultados que se iban obteniendo, se intentó establecer un posible paralelismo entre diferentes mecanismos de regulación. En el presente trabajo se muestra el efecto de la elevación de la temperatura y de la supresión del aporte androgénico sobre la síntesis de proteínas de secreción de la cauda epididimal de conejo. Los resultados obtenidos indican que una relativamente alta temperatura (temperatura corporal) en la cauda produce cambios en la biosíntesis de proteínas de secreción muy similares a los observados después de la castración; tales resultados son de especial importancia pues hasta el momento



presente no se han descrito semejanzas de este tipo. En estudios anteriores Esponda y Bedford ([Esponda, 1986 #8]) consiguieron efectos similares de la castración y la temperatura corporal sobre la composición proteica del fluído de la cauda, sin establecer si las alteraciones encontradas se debían a cambios en la reabsorción, síntesis o secreción, o degradación de macromoléculas.

Los mecanismos de acción de los andrógenos y la temperatura corporal sobre las proteínas de secreción de la cauda parecen ser diferentes según se deduce de las siguientes observaciones: a) Los efectos de la castración y la temperatura corporal fueron muy similares aunque no idénticos; en este sentido, cabe mencionar como la temperatura corporal no induce la síntesis del polipéptido 2, que sin embargo aumenta después de la castración (Fig. 5); b) La administración de andrógenos (incluso altas dosis) no revierte el efecto de la temperatura, excepto en el caso del polipéptido 6, cuya síntesis recupera el nivel de los controles. En contraste, la administración de andrógenos revierte los cambios sobre la síntesis de proteínas de secreción producidos por la castración ([Regalado, 1989 #76]).

Para respaldar estas observaciones se estudiaron los efectos de la castración y la temperatura corporal sobre la concentración caudal del mRNA correspondiente a la EP21. Nos centramos particularmente en este mensajero puesto que la EP21 es un componente de secreción mayoritario del fluído epididimal ([Regalado, 1989 #76]) siendo fácilmente sintetizado e inmunoprecipitado después de la traducción *in vitro* del poli(A)+mRNA epididimal.

Las variaciones observadas a nivel de la biosíntesis de la EP21 se correlacionaron con los cambios encontrados para las concentraciones de su mRNA. La castración y la temperatura corporal disminuyen el nivel de su mRNA aunque, mientras que la suplementación con andrógenos restauró este nivel en los animales castrados, el tratamiento hormonal no produjo efecto alguno sobre las caudas abdominales.

El efecto de la temperatura corporal parece ser particularmente selectivo, puesto que solamente algunas proteínas de secreción se ven afectadas. Más aún, la temperatura corporal no provoca variaciones considerables sobre la cantidad de [<sup>35</sup>S]metionina incorporada en proteínas totales por cantidades similares de explantes cultivados *in vitro*, obtenidos a partir de caudas escrotales y abdominales. Tampoco se observaron efectos apreciables de la temperatura corporal sobre la mayoría de los productos procedentes de la cauda, según se deduce del análisis autorográfico de los productos resultantes de la traducción *in vitro* de cantidades similares de poli(A)+RNA de caudas

escrotales y abdominales (Fig. 8). En relación a este punto, Rasweiler y Bedford ([Rasweiler, 1982 #137]) no encontraron alteraciones a nivel de la ultraestructura de las células epiteliales de la cauda mantenida a temperatura corporal, lo que también sugiere un efecto muy selectivo de la temperatura sobre esta región del epidídimo.

Teniendo en cuenta los efectos similares producidos por la temperatura corporal y la castración, podría pensarse que una temperatura elevada produjera un descenso (o inactivación) en el nivel de receptores androgénicos, impidiéndose así la acción hormonal. La medida de los receptores de andrógenos no evidenció diferencias significativas entre caudas escrotales y epididimales. Existen además una serie de consideraciones en contra de este mecanismo: a) el receptor de andrógenos es completamente funcional en muchos órganos bajo la acción de la temperatura corporal (próstata, vesículas seminales, hígado, riñón); b) la administración de andrógenos revierte el efecto de la temperatura sobre la síntesis del polipéptido 6 (Fig. 5), sugiriendo la existencia de un receptor funcional. Sin embargo, cabe la posibilidad de que otros factores, necesarios para el buen funcionamiento del receptor de andrógenos, pudieran alterarse tras la exposición del epidídimo a la temperatura corporal.

Los resultados obtenidos a partir de los experimentos hasta ahora comentados presentan un interés potencial en campos con la importancia de la Biología de la reproducción y del control de la expresión génica. El efecto de la temperatura sobre la síntesis de proteínas epididimales de secreción puede ser de vital importancia a la hora de profundizar en la funcionalidad del espermatozoide y su almacenamiento en la cauda, dado que estas proteínas de secreción están implicadas en ambos procesos ([Esponda, 1986 #8]),<sup>9</sup> y, ciertamente, alguna de las proteínas reguladas por temperatura mencionadas en este trabajo se asocian selectivamente a la superficie del espermatozoide de conejo almacenado en la cauda ([García, 1988 #77]), como se comentará posteriormente. Por tanto, la variación en la síntesis de polipéptidos de secreción puede alterar la composición proteica del fluido epididimal, de vital importancia para la supervivencia del espermatozoide. En este sentido, dos trabajos ([Bedford, 1991 #7; Esponda, 1986 #8]) han intentado correlacionar variaciones en la supervivencia y capacitación del espermatozoide de la cauda con cambios en el perfil proteico del fluido luminal, producidos de forma similar por la castración o la temperatura corporal.

Por otro lado, los efectos similares producidos por la temperatura corporal y los andrógenos sobre la expresión de varios genes epididimales puede ofrecer un mecanismo interesante para la regulación génica. Solamente podemos especular sobre este

mecanismo, aunque cabe mencionar que la síntesis de la proteína de choque térmico de 90 KDa (inducible por alta temperatura), también se induce por estradiol en el útero ([Ramachandrán, 1988 #138]) y por dexametasona en la línea celular L929 ([Kasambalides, 1983 #139]). La expresión de las proteínas de choque térmico parece estar modulada por la interacción específica de proteínas nucleares específicas con secuencias de DNA próximas al promotor del gen ([Morgan, 1987 #141; Wu, 1984 #140]) de forma que recuerda la interacción de los receptores esteroídicos con secuencias específicas de los genes regulados hormonalmente ([Beato, 1989 #142]). Podría ocurrir que en la cauda epididimal factores nucleares dependientes de temperatura interaccionasen con regiones de algunos genes, regulando su expresión de forma similar a la dirigida por andrógenos.

## 2. PRESENCIA DE PROTEINAS CON CAPACIDAD DE UNION A ACIDO RETINOICO EN EL EPIDIDIMO DE CONEJO.

Varias son las proteínas intracelulares con capacidad de unión a retinol y ácido retinoico que hasta el momento han sido descritas; sin embargo, no es tan elevada la relación de proteínas de secreción que presentan esta capacidad. Recientemente se han descrito proteínas con capacidad de unión a retinoides en las secreciones uterinas de cerdo ([Clawitter, 1990 #151]) y en el fluido epididimal de rata ([Ong, 1988 #115; Newcomer, 1990 #113]). En este último se observan dos isoformas B y C de un polipéptido mayoritario del fluido con  $M_r$  de 18.500 y que es dependiente de andrógenos. Como se ha comentado anteriormente, los datos derivados del presente estudio nos hacen sospechar que la proteína EP21 puede ser la correspondiente a la de 18.5 KDa purificada del lumen epididimal de rata. Con estos antecedentes, se decidió examinar la actividad de unión a retinoico en el fluido de epidídimo de conejo. El análisis de los productos ligados a ácido retinoico, previa incubación *in vitro* con este compuesto tritiado y posterior purificación mediante filtración en gel y cromatografía de intercambio, indicó un fuerte potencial de unión a retinoico para las formas II y III de la EP21. Los resultados obtenidos por Newcomer y *col* en rata ([Newcomer, 1990 #113]) ponen de manifiesto el alto grado de similitud existente entre las dos isoformas B y C anteriormente descritas ([Brooks, 1986 #9]).

También en el conejo las dos isoformas de EP21 parecen muy similares a juzgar por los análisis de mapas peptídicos, análisis de aminoácidos y por su peso molecular. Los mapas peptídicos indican una gran similitud: en HPLC (Fig. 12) 2 o 3 péptidos pueden ser

diferentes, siendo la mayoría comunes; algo similar ocurre en TLC (Fig. 13) donde también la mayoría de los péptidos son comunes pero al menos uno de ellos es claramente diferente. Los análisis de aminoácidos también sugieren un gran parecido entre las isoformas II y III.

Ambas isoformas están glicosiladas por lo que existe la posibilidad de que tengan diferente grado de glicosilación. Esto podría explicar su diferente carga eléctrica y el que algún péptido glicosilado tuviera un diferente comportamiento en los mapas peptídicos. Es difícil, por tanto, asegurar si las dos isoformas difieren ligeramente en estructura primaria o si teniendo la misma secuencia difieren en su grado de glicosilación.

Ambas isoformas tienen idéntica  $M_r$  aparente tanto en filtración en gel en condiciones nativas como en electroforesis desnaturante en presencia de SDS y de agentes reductores de grupos -SH. Estos datos sugieren que las EP21 se encuentran como monómeros en condiciones fisiológicas.

La función de estos polipéptidos está por aclararse pero su capacidad de unión de retinoico es compatible con alguna función del retinoico en el epidídimo o en el espermatozoide. Como se ha mencionado, los retinoides parecen esenciales en el mantenimiento de las funciones reproductivas. El hecho de que se vayan descubriendo proteínas con capacidad de unión de retinoides en las secreciones de los tractos genitales, sugiere que estas proteínas deben tener un importante, sino imprescindible, papel fisiológico. Siendo las EP21 un componente mayoritario del fluido y teniendo una unión de retinoico no saturable, es posible que tengan una función de transporte de este retinoide. En este contexto, se debe recordar que, como se ha demostrado en este trabajo, las EP21 se sintetizan preferencialmente en la región inicial del epidídimo (caput).

Dado que, al menos en rata, las células principales del caput contienen los niveles más elevados de CRBP ([Kato, 1985 #112; Porter, 1985 #111]), cabe pensar que esta región presente un elevado metabolismo o movimiento para la vitamina A.

### **3. ACTIVIDAD ANTIPROTEASA EN EL FLUIDO EPIDIDIMAL.**

Otro de los polipéptidos de secreción de interés observado en este trabajo ha sido un inhibidor de proteasas. La presencia de este polipéptido en el fluido epididimal no implica necesariamente su origen en el epidídimo. Existía la posibilidad de que procediera del trasudado sanguíneo o intercelular (como es el caso de la

seroalbúmina presente en el fluido epididimal) o de la secreción del testículo que es vertida en el epidídimo. Puesto que este inhibidor no ha sido purificado a homogeneidad, no hemos podido demostrar inequívocamente su origen epididimal por medios típicos como inmunohistoquímica, marcaje radiactivo e inmunoprecipitación, etc.. Por tanto acudimos a métodos indirectos para demostrar su origen. La cromatografía en filtración de suero de conejo o de secreción testicular no permitió observar en ellos un inhibidor de proteasas con las características del existente en epidídimo, incluso empleando una cantidad de material de partida en el que teóricamente debería haberse observado tal inhibidor. Todo ello indica que este inhibidor es de origen epididimal.

Un hecho interesante es la dependencia del inhibidor de la presencia de andrógenos. La castración produjo la práctica desaparición del inhibidor. Poirier y col ([Poirier, 1981 #148; Poirier, 1984 #149]) han descrito en el fluido epididimal de ratón inhibidores de tripsina con naturaleza andrógeno-dependiente, autores que sugieren que la presencia de éstos podría estar relacionada con la prevención del daño del epitelio epididimal causado por "fugas" de acrosina a partir de espermatozoides defectuosos.

Este inhibidor epididimal es relativamente selectivo: no inhibe en absoluto la quimotripsina y muy poco la subtilisina. Su mayor actividad es frente a tripsina y acrosina.

Como se comentó en la introducción, la acrosina es una proteasa con actividad tipo tripsina localizada en el acrosoma del espermatozoide de mamíferos y que permite la penetración del espermatozoide en la zona pelúcida del oocito. Diferentes trabajos ([Zaneveld, 1970 #13; Goodpasture, 1981 #106]) muestran como inhibidores de la acrosina son capaces de prevenir el proceso de fertilización tanto *in vitro* como *in vivo*. Estos antecedentes sugerían la posibilidad de que pudieramos encontrarnos ante un inhibidor de acrosina.

Es posible que este inhibidor mantenga inactiva la acrosina del espermio hasta el momento cercano a la fecundación, en el que la acrosina activada ayude a la penetración del espermatozoide en el óvulo.

Alternativamente, la presencia del inhibidor sostenida por sus inductores, los andrógenos, podría impedir procesos de involución de las células epididimales producidos por enzimas similares a tripsina. Esta involución ocurre en el epidídimo tras la supresión de andrógenos por castración, aunque no está demostrada la implicación de enzimas proteolíticos.

#### 4. LOCALIZACION DE PROTEINAS EPIDIDIMALES DE SECRECION ASOCIADAS A LA SUPERFICIE DEL ESPERMATOZOIDE.

Es esta la primera vez en la que se aborda la localización ultraestructural, mediante técnicas de inmunomicroscopía con partículas de oro, de proteínas de secreción epididimales asociadas a la superficie del espermatozoide. Utilizando procedimientos clásicos de inmunofluorescencia, trabajos anteriores han demostrado la asociación de proteínas del fluido epididimal con el espermatozoide ([Brown, 1983 #65; Brooks, 1980 #37; Rifkin, 1985 #55; Smith, 1986 #56]). En el presente trabajo se han utilizado técnicas inmunoultraestructurales con un mejor poder de resolución y sensibilidad que los estudios de inmunofluorescencia mencionados. Como ejemplo de esta mejora en la sensibilidad, cabe mencionar que los resultados aquí presentados, en cuanto a la localización de la EP21 respecta, difícilmente se observaron utilizando las mismas preparaciones de espermatozoides y anticuerpos, en algunos estudios de inmunofluorescencia previamente llevados a cabo por nosotros.

Los resultados obtenidos indican una asociación selectiva de la EP21 a algunas regiones del espermatozoide: la región acrosomal y postacrosomal y el segmento medio, pero no el principal de la cola.

Utilizando un antisuero frente al total proteico del fluido epididimal, de conejo (García y *col*, 1988) observaron que tres regiones principales del espermatozoide unen estas proteínas, regiones denominadas acrosoma, región postacrosomal y segmento medio de la cola. La porción principal de la cola y la región ecuatorial de la cabeza contienen menor cuantía de proteínas epididimales. Esta última observación puede ser importante considerando que el segmento ecuatorial no contiene los enzimas líticos presentes en el resto del acrosoma y que parece ser el sitio inicial de la fusión espermatozoide/oocito.([Bedford, 1979 #78]). Otros estudios (Brooks, 1980; Rifkin, 1985) también han indicado asociación selectiva de proteínas epididimales a la superficie del espermatozoide.

Todos estos datos indican que el segmento principal de la cola se asocia con un relativamente pequeño contenido proteico del medio de la cauda epididimal. Sin embargo, la uteroglobina, componente minoritario de este fluido ([Haro, 1988 #70]), se asocia con este segmento, lo que se confirma por el hecho de que el espermatozoide puede aglutinarse "cola-cola" *in vitro* por el anticuerpo anti-uteroglobina.

En resumen, los resultados de inmunomicroscopía electrónica indican que la asociación de proteínas epididimales al espermatozoide no es al azar, sino que se ajusta a interacciones

específicas con cada dominio morfológico y funcional descrito para el espermatozoide ([Olson, 1983 #143]).

El significado funcional de esta unión diferencial y selectiva de proteínas del fluido epididimal no se ha resuelto por el momento, lo mismo que ocurre con el papel fisiológico exacto de muchas de estas proteínas.

## CONCLUSIONES



## CONCLUSIONES

- 1.- El 8-10% de las proteínas sintetizadas por el epidídimo son de secreción.
- 2.- La síntesis y secreción de varios polipéptidos en el epidídimo de conejo están reguladas por andrógenos
- 3.- La testosterona ejerce un efecto dual, aumentando la síntesis de algunas proteínas específicas y reprimiéndola en otros casos.
- 4.- La elevación de la temperatura en la cauda produce cambios en la biosíntesis de proteínas de secreción muy similares a los observados después de la castración.
- 5.- La EP21 se presenta bajo isoformas muy similares que se sintetizan preferencialmente en la región inicial del epidídimo.
- 6.- La castración y la temperatura corporal disminuyen el nivel del mRNA de la EP21.
- 7.- Las isoformas II y III de la EP21 presentan una fuerte capacidad de unión a ácido retinoico.
- 8.- La EP21 se asocia a las regiones acrosomal, postacrosomal y segmento medio del espermatozoide.
- 9.- Un polipéptido de secreción epididimal dependiente de andrógenos es un inhibidor específico de proteasas.

## BIBLIOGRAFIA

- Amann, R. P. "A Critical Review of Methods for Evaluation of Spermatogenesis from Seminal Characteristics." J. Androl. 2 (1981): 37-58.
- Atherton and Thomson. "Fingerprinting of DNS-labelled Protein Digests." Biochem. J. 111 (1969): 797-798.
- Bayer, Edward A., Haya Ben-Hur, and Meir Wilchek. "Enzyme-Based Detection of Glycoproteins on Blot Transfers Using Avidin-Biotin Technology." Anal. Biochem. 161 (1987): 123-131.
- Bearer, Elaine L. and Daniel S. Friend. "Morphology of Mammalian Sperm Membranes During Differentiation, Maturation, and Capacitation." J. Electron. Micr. Tech. 16 (1990): 281-297.
- Beato, M. "Gene Regulation by Steroid Hormones." Cell 56 (1989): 335-344.
- Bedford, J. M. "Maturation, Transport and Fate of Spermatozoa in the Epididymis." In Handbook of Physiology, ed. D. W. Hamilton and R. O. Greep. 303-317. V. Washington, DC.: American Physiological Society, 1975.
- Bedford, J. Michael. "Influence of Abdominal Temperature on Epididymal Function in the Rat and Rabbit." Am. J. Anat. 152 (4 1978): 509-522.
- Bedford, J. M., H. D. M. Moore, and L. E. Franklin. "Significance of the equatorial Segment of the Acrosome of the Spermatozoa in Eutherian Mammals." Exp. Cell Res. 119 (1979): 119-126.
- Bedford, J.M. and R. Yanagimachi. "Epididymal storage at abdominal temperature reduces the time required for capacitation of hamster spermatozoa." J. Reprod. Fert. 91 (1991): 403-410.
- Bedford, J. M. and G. W. Cooper. "Membrane Fusion Events in the Fertilization of Vertebrate Eggs." In Membrane Fusion, ed. G. Poste and G. L. Nicolson. 65-125. 5. Amsterdam: Elsevier, 1978.
- Berger, Franklin G., David Loose, Herman Meisner, and Gordon Watson. "Androgen Induction of Messenger RNA Concentrations in

- Mouse Kidney is Posttranscriptional." Biochem. 25 (5 1986): 1170-1175.
- Blomhoff, R., M. H. Green, T. Berg, and K. R. Norum. "Transport and Storage of Vitamin A." Science 250 (1991): 399-404.
- Bonner, W. M. and R. A. Laskey. "A Film Detection Method for Tritium-labeled Proteins and Nucleic Acids in Polyacrylamide Gels." Eur. J. Biochem. 46 (1974): 83-88.
- Bradford, M. M. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding." Anal. Biochem. 72 (1976): 248-254.
- Bradford, M. M., A. B. Dudkiewicz, G. S. Penny, D. F. Dyckes, B. D. Burleigh, R. E. Wooley, and M. A. McRorie. "Localization of proacrosin on the inner acrosomal membrane of spermatozoa in rabbits and hamsters." Am. J. Vet. Res. 42 (1981): 1082-1083.
- Brawermann, G. "The Isolation of Messenger RNA from Mammalian Cells." Methods. Enzymol. 30 (1974): 605-630.
- Brokaw, Charles J. "Regulation of Sperm Flagellar Motility by Calcium and cAMP-Dependent Phosphorylation." J. Cell. Biochem. 35 (1987): 175-184.
- Brooks, D. E. "Effect of Androgen on Protein Synthesis and Secretion in Various Regions of the Rat Epididymis, as analysed by Two-Dimensional Gel Electrophoresis." Mol. Cell. Endocrinol. 29 (1983): 255-270.
- Brooks, David E. "Protein Secretion by the Rat Epididymis Can Be Selectively Modified *in Vitro* by Local Anesthetics, Glucose Deprivation, Dinitrophenol, Ouabain, and Ionophores." J. Androl. 5 (1984): 351-360.
- Brooks, David E. "Characterization of a 22 kDa Protein with Widespread Tissue Distribution But Which Is Uniquely Present in Secretions of the Testis and Epididymis and on the Surface of Spermatozoa." Biochim. Biophys. Acta 841 (1985): 59-70.
- Brooks, D. E. and S. J. Higgins. "Characterization and Androgen-dependence of Proteins Associated with Luminal Fluid and Spermatozoa in the Rat Epididymis." J. Reprod. Fert. 59 (1980): 363-375.

Brooks, David. E., Anthony R. Means, Elizabeth J. Wight, Surinder P. Singh, and Kristen K. Tiver. "Molecular Cloning of the cDNA for two major androgen-dependent Secretory proteins of 18.5 Kilodaltons synthesized by the rat epididymis." J. Biol. Chem. 261 (11 1986): 4956-4961.

Brooks, D. E. and K. Tiver. "Localization of Epididymal Secretory Proteins on Rat Spermatozoa." I. Reprod. Fertil. 69 (2 1983): 651-657.

Brown, C. R., K. I. von Glos, and R. Jones. "Changes in Plasma Membrane Glycoproteins of Rat Spermatozoa During Maturation in the Epididymis." J. Cell Biol. 96 (1983): 256-264.

Brown, C. R. and E. F. Hartree. "Effect of Acrosin Inhibitors in the Soluble and Membrane-bound forms of Ram Acrosin and a Reappraisal of the Role of the Enzyme in Fertilization." Hoppe Selye's Z Physiol. Chem. 357 (1976): 57-65.

Burnette, W. N. "'Western Blotting': Electrophoretic Transfer of Proteins from Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gels to Unmodified Nitrocellulose and Radiographic Detection with Antibody and Radioiodinated Protein A." Anal. Biochem. 112 (1981): 195-203.

Cafilisch, Carlton R. and Thomas D. DuBose. "Effect of Vasectomy on in situ pH in Rat Testis and Epididymis." Contraception 42 (5 1990): 589-595.

Chang, Ch. H., D. R. Rowley, T. J. Lobl, and D. J. Tindall. Biochemistry 21 (1981): 4102-4109.

Chang, M. C. "The Meaning of Sperm Capacitation: a Historical Perspective." J. Androl. 5 (1984): 45-50.

Chatterjee, B., D. Majundar, O. Ozliben, C. V. Ramana Murty, and A. K. Roy. "Molecular Cloning and Characterization of cDNA for Androgen-repressible Rat Liver Protein, SMP-2." J. Biol. Chem. 262 (1987): 822-825.

Cheng, C. Yang and C. Wayne Bardin. "Identification of Two Testosterone-responsive Testicular Proteins in Sertoli Cell-enriched Culture Medium Whose Secretion is Suppressed by Cells of the Intact Seminiferous Tubule." J. Biol. Chem. 262 (26 1987): 12768-12779.

Chytil, F. and D. Ong. "Cellular-binding Proteins for Compounds with Vitamin A activity." In Receptors and Hormone Action, ed. O'Malley and Birnbaumer. 573-591. New York: Academic Press, 1978.

Clawitter, J. J. Biol. Chem. 265 (1990): 3248.

Clawitter, J., W. E. Trout, M. G. Burket, S. Araghi, and R. M. Roberts. "A Novel Family of Progesterone-induced, Retinol-binding Proteins from Uterine Secretions of the Pig." J. Biol. Chem. 265 (6 1990): 3248-3255.

Cooke, Paul S., Peter F. Young, and Gerald R. Cunha. "A new Model system for studying Androgen-Induced Growth and Morphogenesis *in Vitro* : The Bulbourethral gland." Endocrinology 121 (1987): 2161-2170.

Cowan, Ann E., Paul Primakoff, and Diana G. Myles. "Sperm Exocytosis Increases the Amount of PH-20 Antigen on the Surface of Guinea Pig Sperm." J. Cell Biol. 103 (1986): 1289-1297.

Cuasnicu, P. S., M. F. D. Gonzalez Echeverría, A. D. Piazza, M. S. Cameo, and J. A. Blaquier. "Antibodies Against Epididymal Glycoproteins Block Fertilizing Ability in the Rat." J. Reprod. Fert. 72 (1984): 467-471.

Danzo, Benjamin J. and Beverly W. Bell. "The microheterogeneity of Androgen-Binding Protein in rat serum and epididymis is due to differences in glycosilation of their subunits." J. Biol. Chem. 263 (5 1988): 2402-2408.

Danzo, Benjamin J., Spyros N. Pavlou, and Heather L. Anthony. "Hormonal Regulation of Androgen-Binding Protein in the Rat." Endocrinology 127 (1990): 2829-2838.

Davis, B. K. and N. V. Davis. "Binding of Glycoproteins of Seminal Plasma Membrane Vesicles Accelerates Decapacitation in Rabbit Spermatozoa." Biochem. Biophys. Acta 727 (1983): 70-76.

Delongas, Jean-Luc and Jean Louis Gelly. "Differentiation of rat epididymis after withdrawal of androgen." Cell Tissue Res. 241 (1985): 657-662.

Depeiges, A., F. Morel, and J. P. Dufaure. "Identification of an Epididymal Protein Family: Sequential Appearance Under Testosterone Stimulation." Biochim. Biophys. Acta 964 (1988): 383-387.

D'Agostino, Angela, Roy Jones, Roger White, and Malcolm G. Parker. "Androgenic Regulation of Messenger RNA in rat Epididymis." Biochem. J. 190 (1980): 505-512.

Edwards, M. J., P. J. Dykes, M. R. O. Donovan, V. R. Merrett, H. E. Morgan, and R. Marks. "Induction of Heat Shock Proteins as a Measure of Chemical Cytotoxicity." Toxic. in Vitro 4 (4/5 1990): 270-276.

Esponda, P. and J. M. Bedford. "Surface of the Rooster Spermatozoon Changes in Passing Through the Wolffian Duct." I. Exp. Zool. 234 (1985): 441-449.

Esponda, P. and J.M. Bedford. "The influence of body temperature and castration on the protein composition of fluid in the rat cauda epididymidis." J. Reprod. Fert. 78 (1986): 505-514.

Fairbanks, G., N. C. Stech, and D. F. Wallach. "Electrophoretic Analysis of the major Polypeptides of the Human Erythrocyte Membrane." Biochemistry 10 (1981): 2606-2617.

Faulk, W. P. and G. M. Taylor. "An Immuno-colloid Method for the Electron Microscope." Immunochemistry 8 (1971): 1081-1083.

Faure. Biol. Rep. 44 (1991): 13-22.

Fernández-Renau, D., M. Lombardero, and A. Nieto. "Glucocorticoid-dependent Uteroglobin Synthesis and Uteroglobin mRNA Levels in Rabbit Lung Explants Cultured *in Vitro*." Eur. J. Biochem. 144 (1984): 523-527.

Flickinger, Charles J. "Regional differences in Synthesis, Intracellular Transport, and Secretion of Protein in the Mouse Epididymis." Biol. Reprod. 25 (4 1981): 871-883.

Flickinger, Charles J., John C. Herr, and Kenneth L. Klotz. "Immunocytochemical Localization of the Major Glycoprotein of Epididymal Fluid from the Cauda in the Epithelium of the Mouse Epididymis." Cell Tissue Res. 251 (3 1988): 603-610.

García, C., F. Regalado, M. S. López de Haro, and A. Nieto. "Ultrastructural Localization of Epididymal Secretory Proteins Associated with the Surface of Spermatozoa from Rabbit Cauda Epididymis." Histochem. J. 20 (1988): 708-714.

Gerard, A., J. Khanfri, J. L. Gueant, S. Fremont, and J. P. Nicolas. "Electron Microscope Radioautographic Evidence of *in Vivo* Androgen- Binding Protein Internalization in the rat Epididymis Principal Cells." Endocrinology 122 (1988): 1297-1307.

Goodpasture, J. C., J. M. Reddy, and L. J. D. Zaneveld. "Acrosin, Proacrosin, and Acrosome Inhibitor of Guinea Pig Spermatozoa Capacitated and Acrosome Reacted." Biol. Reprod. 25 (1981): 44-45.

Gott, Amanda L., Susan M. Gray, A. F. James, and H.J. Leese. "The mechanism and control of rabbit oviduct fluid formation." Biol. Reprod. 39 (1988): 758-763.

Hamilton, D. W. Structure and Function of the Epithelium Lining the Ductuli Efferentes, Ductus Epididymidis, and Ductus Deferens in the Rat. Vol. 5, Male Reproductive System. Handbook of Physiology, ed. D. W. Hamilton and R. O. Greep. Washington DC: Amer. Physiol. Soc., 1975.

Hanspal, J. S., G. R. Bushell, and P. Ghosh. "Detection of Protease Inhibitors Using Substrate-containing Sodium Dodecyl Sulfate-polyacrylamide Gel Electrophoresis." Anal. Biochem. 132 (1983): 288-293.

Haro, M. S. López de, L. Alvarez, and A. Nieto. "Testosterone Induces the Expression of the Uteroglobin Gene in Rabbit Epididymis." Biochem. J. 250 (1988): 647-651.

Higgins, Stephen J. and Joy M. Burchell. "Effects of Testosterone on Messenger Ribonucleic Acid and Protein Synthesis in Rat Seminal Vesicle." Biochem. J. 174 (1978): 543-551.

Higgins, Stephen J., Joy M. Burchell, and W. Ian P. Mainwaring. "Androgen-dependent Synthesis of Basic Secretory Proteins by the Rat Seminal Vesicle." Biochem. J. 158 (1976): 271-282.

Higgins, Stephen J., Joy M. Burchell, Malcolm G. Parker, and David G. Herries. "Effects of Testosterone on Sequence Complexity of Polyadenylated RNA from Rat Seminal Vesicle." Eur. J. Biochem. 91 (1978): 327-334.

Holland, Michael K. and Marie Claire Orgebin-Crist. "Characterization and Hormonal Regulation of Protein Synthesis by the Murine Epididymis." Biol. Reprod. 38 (2 1988): 487-496.

Iusem, Norberto D., Lucrecia Pineiro, Jorge A. Blaquier, and Enrique Belocopitow. "Identification of a Major Secretory Glycoprotein from Rat Epididymis: Interaction with Spermatozoa." Biol. Reprod 40 (2 1989): 307-316.

Johnson, L. A., D. L. Garner, A. J. Truitt-Gilbert, and B. A. Lessley. "Immunocytochemical localization of acrosin on both acrosomal membranes and in the acrosomal matrix of porcine spermatozoa." J. Androl. 4 (1983): 222-229.

Jones, R., C. R. Brown, K. I. von Glos, and M. G. Parker. "Hormonal Regulation of Protein Synthesis in the Rat Epididymis. Characterization of Androgen-dependent and Testicular Fluid-dependent Proteins." Biochem. J. 188 (1980): 667-676.

Jones, R., K. I. Von Glos, and C. R. Brown. "Changes in the Protein Composition of Rat Spermatozoa During Maturation in the Epididymis." J. Reprod. Fertil. 67 (2 1983): 299-306.

Jones, Roy, Karoly I. von Glos, and Colin R. Brown. "Characterization of hormonally regulated secretory proteins from the caput epididymis of the rabbit." Biochem. J. 196 (1981): 105-114.

Jones, R. and T. D. Glover. Interrelationships between Spermatozoa, the Epididymis and Epididymal plasma. Vol. 7. The Biology of the Male Gamete, ed. J. G. Duckett and P. M. Racey. 1975.

Kaempfer, R. and A. M. Konijn. "Translational Competition by mRNA Species Encoding Albumin, Ferritin, Haemopexin and Globin." Eur. J. Biochem. 131 (1983): 545-548.

Kasambalides, E. J. and K. W. Lanks. "Dexamethasone Can Modulate Glucose-regulated and Heat Shock Protein Synthesis." J. Cell Physiol. 114 (1983): 93-98.

Kato, M., K. S. Weng, K. Kato, and d. S. Goodman. "Immunohistochemical Studies on the Localization of Cellular Retinol-binding Protein in Rat Testis and Epididymis." Biol. Reprod. 32 (1985): 178-189.

Kenneth, L. and R. F. Parrish. "Boar Proacrosin, Purification and Preliminary Activation Studies of Proacrosin Isolated from Ejaculated Boar Sperm." J. Biol. Chem. 252 (6 1977): 1888-1894.

Kierszenbaum, A. L., Oscar A. Lea, Peter Petrusz, Frank S. French, and Laura L. Tres. "Isolation, culture, and immunocytochemical



characterization of epididymal epithelial cells from pubertal and adult rats." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (3 1981): 1675-1679.

Kohane, Adriana C., F. M. C. Gonzalez Echeverría, Lucrecia Pineiro, and Jorge A. Blaquier. "Interaction of Proteins of Epididymal Origin with Spermatozoa." Biol. Reprod. 23 (4 1980): 737-742.

Krawczyk, Zdzislaw, Norbert Szymik, and Jan Wisniewski. "Expression of hsp70-related Gene in Developing and Degenerating Rat Testis." Mol. Biol. Rep. 12 (1987): 35-41.

Krawczyk, Zdzislaw, Jan Wisniewski, and Elzbieta Biesada. "A hsp70-related Gene is Constitutively highly Expressed in Testis of Rat and Mouse." Mol. Biol. Rep. 12 (1987): 27-34.

Kreil, G. "Transfer of Proteins Across Membranes." Ann. Rev. Biochem. 50 (1981): 317-348.

Kumar, Raj, M. J. K. Harper, and D. J. Hanahan. "Occurrence of platelet-activating factor in rabbit spermatozoa." Arch. Biochem. Biophys. 260 (1 1988): 497-502.

Laemli, U. K. "Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." Nature 227 (1970): 680-685.

Laemmli, U. K. "Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." Nature 227 (1970): 680-685.

Leake, R. E. and F. Habib. "Steroid Hormones, a Practical Approach." In Practical Approach Series, ed. D. Rickwood and B. D. Hames. 67-92. 1987 ed., Vol. Oxford: IRL Press, 1987.

Leese, H. J. "The formation and function of oviduct fluid." J. Reprod. Fert. 82 (1988): 843-856.

Léger, Jocelyne G., Michael L. Montpetit, and Martin P. Tenniswood. "Characterization and Cloning of Androgen-repressed mRNAs from Rat Ventral Prostate." Biochem. Biophys. Res. Co. 147 (1 1987): 196.

Lemaire, L. and U. A. O. Heinlein. "Detection of Secreted and Temporarily Inducible Heat Shock Responsive Proteins in Mouse Testicular Tissue." Life Sci. 48 (4 1991): 365-372.

Lombardero, M. and A. Nieto. "Glucocorticoid and Developmental Regulation of Uteroglobin Synthesis in Rabbit Lung." Biochem. J. 200 (1981): 487-494.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent." J. Biol. Chem. 193 (1951): 265-275.

Luca, L.M. De. "Retinoids and their Receptors in Differentiation, Embryogenesis and Neoplasia." FASEB J. 5 (1991): 2924-2933.

Maerki, W., W. Zimmermann, M. Faupel, and E. Vonarx. "Bioautography of Proteinase Inhibitors of Microbial Origin - A Simple Enzymatic Detection Procedure on Casein Agar Plates." J. Chromatogr. 283 (1984): 406-411.

Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. ed. Cold Spring Harbor, N. Y.: 1982.

Matusik, R. J., C. Kreis, P. McNicol, R. Sweetland, C. Mullin, W. H. Fleming, and J. G. Dodd. "Regulation of Prostatic Genes: Role of Androgens and Zinc in Gene Expression." Biochem. Cell Biol. 64 (1986): 601-607.

McRorie, R. A. and W. L. Williams. Annu. Rev. Biochem. 43 (1974): 777-803.

Mills, John S., Maurice Needham, and Malcolm G. Parker. "Androgen Regulated Expression of a Spermine Binding Protein gene in Mouse Ventral Prostate." Nucleic Acids Res. 15 (19 1987):

Mongkolsirikieat, S. and M. Chulavatnatol. "Phosphorylated secretory proteins from rat epididymis and their androgenic control." J. Reprod. Fert. 72 (1984): 423-428.

Moore, Alison, Len Hall, and David W. Hamilton. "An 18-kDa androgen-regulated protein that modifies galactosyltransferase activity is synthesized by the rat caput epididymidis, but has no structural similarity to rat milk alpha-lactalbumin." Biol. Reprod. 43 (1990): 497-506.

Moore, H. D. M. "Localization of Specific Glycoproteins Secreted by the Rabbit and Hamster Epididymis." Biol. Reprod. 22 (1980): 705-718.

Moore, H. D. M. "Effect of Castration on Specific Glycoprotein Secretions of the Epididymis in the Rabbit and Hamster." J. Reprod. Fertil. 61 (2 1981): 347-354.

Moore, H. D. M. "Glycoprotein Secretions of the Epididymis in the Rabbit and Hamster: Localization on Epididymal Spermatozoa and the Effect of Specific Antibodies on Fertilization *In Vivo*." J. Exp. Zool. 215 (1981): 77-85.

Moore, H. D. M. and J. M. Bedford. "Short-term Effects of Androgen Withdrawal on the Structure of Different Epithelial Cells in the Rat Epididymis." Anat. Rec. 193 (2 1979): 293-312.

Morgan, W. D., G. T. Williams, R. I. Morimoto, J. Greene, R. E. Kingston, and R. Tjian. "Two Transcriptional Activators, CCAAT-Box-binding Transcription Factor and Heat Shock Transcription Factor Interact with a Human hsp70 Gene Promoter." Mol. Cell Biol. 7 (1987): 1129-1138.

Newcomer, M. E. and D. E. Ong. "Purification and Crystallization of a Retinoic Acid-binding Protein from Rat Epididymis." J. Biol. Chem. 265 (22 1990): 12876-12879.

Nieto, A. and M. Beato. "Synthesis and Secretion of Uteroglobulin in Rabbit Endometrial Explants Cultured *in Vitro*." Mol. Cell. Endocrinol. 17 (1980): 25-39.

Normand, Thierry, Christiane Jean-Faucher, and Claude Jean. "Neonatal exposure to oestrogens alters the protein profiles and gene expression in the genital tract of adult male mice." J. Steroid. Biochem. 36 (5 1990): 415-423.

Oliphant, Gene and Charles A. Singhas. "Iodination of Rabbit Sperm Plasma Membrane: Relationship of Specific Surface Proteins to Epididymal function and Sperm Capacitation." Biol. Reprod. 21 (1979): 937-944.

Olson, G. E. and B. J. Danzo. "Surface Changes in Rat Spermatozoa During Epididymal Transit." Biol. Reprod. 24 (2 1981): 431-443.

Olson, Gary E. and Barry T. Hinton. "Regional Differences in Luminal Fluid Polypeptides of the Rat Testis and Epididymis Revealed by Two-dimensional Gel Electrophoresis." J. Androl. 6 (1985): 20-34.

Olson, G. E., T. D. Noland, V. P. Winfrey, and D. L. Garbers. "Substructure of the Postacrosomal Sheath of Bovine Spermatozoa." J. Ultrastruct. Res. 85 (1983): 204-218.

Ong, D. E. and F. Chytil. "Presence of Novel Retinoic Acid-Binding Proteins in the Lumen of Rat Epididymis." Arch. Biochem. Biophys. 267 (2 1988): 474-478.

Ong, D. E., J. A. Crow, and F. Chytil. "Radioimmunochemical Determination of Cellular Retinol- and Cellular Retinoic Acid-binding Proteins in Cytosol of Rat Tissues." J. Biol. Chem. 257 (1982): 13385-13389.

Orgebin-Crist, Marie-Claire, Loren H. Hoffman, Gary E. Olson, and Marjorie D. Skudlarek. "Secretion of proteins and glycoproteins by perfused rabbit corpus epididymal tubules: Effect of castration." Am. J. Anat. 180 (1987): 49-68.

Orgebin-Crist, M. C., B. J. Danzo, and J. Davis. "Endocrine Control of the Development and Maintenance of the Sperm Fertilizing Ability in the Epididymis." In Handbook of Physiology, ed. D. W. Hamilton and R. O. Greep. 319-383. V. Washington, DC.: American Physiological Society, 1975.

Overstreet, J. W. and J. M. Bedford. "Transport, Capacitation, and Fertilizing Ability of Epididymal Spermatozoa." J. Exp. Zool. 189 (1974): 203-214.

O'Rand, Michael G. "Esperm-Egg Recognition and Barriers to Interspecies Fertilization." Gamete Res. 19 (1988): 315-328.

O'Rand, Michael G. and Charles B. Metz. "Isolation of an "Immobilizing Antigen" from Rabbit Sperm Membranes." Biol. Reprod. 14 (1976): 586-598.

Poirier, G. R. and J. Jackson. "Isolation and Characterization of Two Proteinase Inhibitors from the Male Reproductive Tract of Mice." Gamete Res. 4 (1981): 555-569.

Poirier, G. R. and N. Nicholson. "Distribution of a Proteinase Inhibitor of Epididymal Origin in the Tissues and Secretions of the Male Reproductive Tract of Mice." J. Exp. Zool. 230 (1984): 465-472.

Porter, S. B., D. E. Ong, F. Chytil, and M. C. Orgebin-Crist. "Localization of Cellular Retinol-binding Protein and Cellular Retinoic Acid-binding Protein in the Rat Testis and Epididymis." J. Androl. 6 (1985): 197-212.

Ramachandran, C., M. G. Catelli, W. Schneider, and G. Shyamala. "Estrogenic Regulation of Uterine 90-Kilodalton Heat Shock Protein." Endocrinology 123 (1988): 956-961.

Rasweiler, J. J. and J. M. Bedford. "Biology of the Scrotum III. Effect of Abdominal Temperature upon the Epithelial Cells of the Rat Cauda Epididymidis." Biol. Reprod. 26 (1982): 691-705.

Regalado, F. and A. Nieto. "In Vitro Biosynthesis and Secretion of Rabbit Epididymal Secretory Proteins: Regulation by Androgens." J. Exp. Zool. 250 (1989): 214-218.

Rifkin, Jed M. and Gary E. Olson. "Characterization of Maturation-dependent Extrinsic Proteins of the Rat Sperm Surface." J. Cell Biol. 100 (1985): 1582-1591.

Saltzman, A. G., R. A. Hiipakka, C. Chang, and S. Liao. "Androgen Repression of the Production of a 29-kilodalton Protein and its mRNA in the Rat Ventral Prostate." J. Biol. Chem. 262 (1987): 432-437.

Sar, Madhabananda, Dennis B. Lubahn, Frank S. French, and Elizabeth M. Wilson. "Immunohistochemical Localization of the Androgen Receptor in Rat and Human Tissues." Endocrinology 127 (1990): 3180-3186.

Sarath, G. and R.S. de la Motte. "Protease Assay Methods." In Proteolytic Enzymes. A Practical Approach, 25-55. Oxford: IRL Press, 1989.

Saxena, N. K., L. D. Russel, N. Saxena, and R. N. Peterson. "Immunofluorescence Antigen Localization on Boar Sperm Plasma Membranes: Monoclonal Antibodies Reveal Apparent New Domains and Apparent Redistribution of Surface Antigens During Sperm Maturation and at Ejaculation." Anat. Rec 214 (1986): 238-252.

Sharpe, Richard M. and Tony J. Harmer. "The Nature and Biological Actions of "Testicular LHRH"." Hormones and Cell Regulation 7 (1983): 217-230.

Sherman, M. R. Ann. Rev. Physiol. 46 (1984): 83-105.

Smith, C. A., T. D. Hartman, and H. D. M. Moore. "A Determinant of  $M_r$  34 000 Expressed by Hamster Epididymal Epithelium Binds Specifically to Spermatozoa in Co-culture." J. Reprod. Fert. 78 (1986): 337-345.

Swinne, Kristien, Jean Cailleau, Walter Heyns, and Guido Verhoeven. "Prostatic Stromal Cells and testicular peritubular cells produce similar paracrine mediators of androgen action." Endocrinology 126 (1990): 142-150.

Tesarik, J. and J. Drahorad. "Acrosin Activation Follows its Surface Exposure and Precedes Membrane Fusion in Human Sperm Acrosome Reaction." Development 110 (1990): 391-400.

Tezón, Jorge T. and Jorge A. Blaquier. "The organ culture of human epididymal tubules and their response to androgens." Mol. Cell. Endocrinol. 21 (1981): 233-242.

Thomas, Ted S., Al B. Reynolds, and Gene Oliphant. "Evaluation of the site of synthesis of rabbit sperm acrosome stabilizing factor using immunocytochemical and metabolic labeling techniques." Biol. Reprod. 30 (1984): 693-705.

Toney, Thomas W. and Benjamin J. Danzo. "Developmental changes in and Hormonal Regulation of estrogen and androgen receptors present in the rabbit epididymis." Biol. Reprod. 39 (1988): 818-828.

Toney, Thomas W. and Benjamin J. Danzo. "Androgen and estrogen effects on protein synthesis by the adult Rabbit Epididymis." Endocrinology 125 (1 1989): 243-249.

Toney, Thomas W. and Benjamin J. Danzo. "Estrogen and Androgen regulation of protein synthesis by the immature rabbit epididymis." Endocrinology 125 (1 1989): 231-242.

Towbin, H., T. Staehlin, and J. Gordon. "Electrophoretic Transfer of Proteins from polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979): 4350-4354.

Towbin, H., T. Staehlin, and J. Gordon. "Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76 (1979): 4350-4354.

Tschesche, H., S. Kupfer, O. Lengel, and R. Klausner. "Purification, Characterization, and Structural Studies of Proteinase Inhibitors from Boar Seminal Plasma and Boar Spermatozoa." In Bayer-Symposium V "Proteinase Inhibitors" in edited by H. Fritz, H. Tschesche, L. J. Greene, and E. Truscheit, , 156-163, Year.

- Turner, T. T., J. L. Plesums, and C. L. Cabot. "Luminal Fluid Proteins of the Male Rat Reproductive Tract." Biol. Reprod. 21 (1979): 883-890.
- Vernon, Robert B., Charles H. Muller, and E. M. Eddy. "Further Characterization of a Secreted Epididymal Glycoprotein in Mice that Binds to Sperm Tails." J. Androl. 8 (3 1987): 123-128.
- Wassarman, Paul M. "Early Events in Mammalian Fertilization." Ann. Rev. Cell Biol. 3 (1987): 109-142.
- Wong, P. Y. D. and A. Y. F. Tsang. "Radioimmunoactivity and Receptor Binding Activity of Specific Epididymal Proteins of the Rat and Other Species." Nucleic Acids Res. 114 (2 1983):
- Wu, C. "Two Protein-binding Sites in Chromatin Implicated in the Activation of Heat-shock Genes." Nature 309 (1984): 229-234.
- Yamamoto, K. R. Ann. Rev. Genet. 19 (1985): 209-252.
- Zahler, W. L. and K. L. Polakoski. Biochim. and Biophys Acta (1977):
- Zaneveld, L. J. D., K. L. Polakoski, and G. F. B. Schumacher. "The Proteolytic Enzyme Systems of Mammalian Genital Tract Secretions and Spermatozoa." In Proteases and Biological Control: Conferences on Cell Proliferation in Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., edited by E. Reich, D. B. Rifkin, and E. Shaw, , 683-705, Year.
- Zaneveld, L. J. D., R. T. Robertson, M. Kessler, and W. L. Williams. "Inhibition of Fertilization *in vivo* by Pancreatic and Seminal Plasma Trypsin Inhibitors." J. Reprod. Fert. 25 (1971): 387-392.
- Zaneveld, L.J.D., P.N. Srivastava, and Williams L. Williams. "Inhibition by seminal plasma of acrosomal enzymes in intact sperm." P.S.E.B.M. 133 (1970): 1172-1174.
- Zehab, Ron and George A. Orr. "Characterization of a Maturation-associated Glycoprotein on the Plasma Membrana of Rat Caudal Epididymal Sperm." J. Biol. Chem. 259 (2 1984): 839-848.