

Los Conjugados de Espermatozoides (Asociación de Varios Espermatozoides en el Epidídimo) Alcanzan la Zona de Fertilización en la Rata, pero Fecunda sólo un Espermatozoide

Sperm Conjugates (Association of Several Sperm in the Epididymis) Reach Zone Fertilization in Rats, but Fertilizes Only One Sperm

Monclus María Ángeles* & Fornés Miguel Walter*

MONCLUS, M. Á. & FORNÉS, M. W. Los conjugados de espermatozoides (asociación de varios espermatozoides en el epidídimo) alcanzan la zona de fertilización en la rata, pero fecunda sólo un espermatozoide. *Int. J. Med. Surg. Sci.*, 2(4):663-670, 2015.

RESUMEN: En mamíferos se produce el fenómeno de conjugación espermática, tanto dentro del epidídimo como post eyaculación. Los conjugados espermáticos consisten en decenas hasta cientos de espermatozoides asociados. La conjugación de espermatozoides se ha encontrado en el eyaculado de algunas especies pero se desconoce si ascienden por el tracto femenino alcanzando la zona de fertilización (tercio distal de las trompas) y si la disociación es previa o durante la interacción con el cumulus ovocitario. Se han propuesto distintos mecanismos por los cuales la formación de estas estructuras favorecerían la fecundación: a. incremento en la velocidad de desplazamiento por sinergia respecto de espermatozoides individuales, particularmente en casos de competencia espermática, b. protección de los espermatozoides conjugados frente al medio hostil, c. prevención de una reacción acrosomal anticipada, entre otros. Nuestro grupo describió este fenómeno en rata y ratón denominándolos Rosetas y propusimos un posible mecanismo asociativo. Estos conjugados consisten en grupos de espermatozoides unidos por sus cabezas y con sus flagelos libres en un número no menor a 10 células. Se describieron dentro del lumen de la región de la cola del epidídimo, pero no en localizaciones más proximales, sugiriendo que para asociarse entre sí los espermatozoides deben haber madurado y tomado contacto con factores del fluido epididimario. Para conocer cuál es el destino final de los conjugados espermáticos se estudió la presencia de gametas masculinas conjugadas o no en el tracto genital femenino de rata luego de la eyaculación. Muestras del contenido de las trompas obtenidas a diferentes tiempos post apareamiento nos permitieron observar conjugados cerca de los complejos cumulus - ovocito. Pero sólo se observaron espermatozoides individuales entre las células del cumulus. Esto sugiere que los conjugados de espermatozoides luego de alcanzar la zona de fertilización se separan en espermatozoides individuales.

PALABRAS CLAVE: Sperm; Oviduct; Cumulus Fertilization.

INTRODUCCIÓN

En una revisión reciente se retomó la clasificación de espermatozoides conjugados (EC) en el interior del aparato genital femenino detectadas en algunas especies de mamíferos (Higginson & Pitnick, 2011). Esta conjugación fue redefinida como una interacción

célula a célula en la que dos o más espermatozoides se unen físicamente para mejorar su motilidad o el transporte a través del tracto reproductor femenino (Pitnick *et al.*, 2009). Los EC pueden unirse dentro del aparato reproductor femenino o bien, como clá-

* Instituto de Histología y Embriología de Mendoza (IHEM). Área de Histología y Embriología. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Cuyo, CONICET, Mendoza, Argentina.
Subsidios: CIUDA - UDA, PIP CONICET y SECTyP - UNCuyo.

sicamente se los describió, vinculados al tránsito epididimario.

Ambos tipos de EC consisten en la aglutinación de dos o más espermatozoides vivos y, en la mayoría de los casos, unidos por sus cabezas. Cuando la conjugación se produce dentro del lumen epididimario es sólo en las regiones más distales de este órgano (última porción del cuerpo y cola), lo que sugiere que es necesaria la adquisición de un cierto grado de madurez por parte de estas células para poder asociarse. La primera referencia encontrada en la literatura es una descripción de los "rouleaux" en el conejillo de Indias, *Cavia porcellus* (Simeone & Young, 1931) presentes en la luz del conducto epididimario en la región caudal. Estos "rouleaux" están formados por varios espermatozoides con sus cabezas apiladas y presentan un material filamentososo en las zonas de contacto entre las membranas plasmáticas. Las colas de los espermatozoides asociados pueden moverse libremente favoreciendo el desplazamiento de estos "rouleaux" en un medio de cultivo definido (Fawcett & Hollenberg, 1963). Los "rouleaux" se disocian progresivamente con el tiempo dentro de la cavidad uterina (*in vivo*) después de la eyaculación y también *in vitro* (medio de cultivo). Tung *et al.*, en 1980 propusieron que la formación de "rouleaux" juega un posible papel protector, que impide la reacción acrosomal prematura y preserva la viabilidad de los espermatozoides.

En cuanto a los animales utilizados frecuentemente en el laboratorio, los primeros estudios relacionados con este fenómeno fueron los de Fornés & Burgos (1990, 1994). Estos autores obtuvieron pequeñas gotas del contenido del epidídimo de rata por punción (*Rattus norvegicus*) de diferentes regiones del epidídimo. El material obtenido se colocó sobre una pequeña gota de solución salina equilibrada (BSS) (Radigue *et al.*, 1988). Las muestras obtenidas de cabeza y cuerpo no mostraron espermatozoides asociados, sino células aisladas con movimientos circulares (cabeza) o motilidad circular y progresiva (cuerpo). Sin embargo, cuando las muestras se obtuvieron de la región más distal o cola, se observó una asociación espermatozoides formada por un grupo de células móviles unidas por sus cabezas. Fornés y Burgos en 1990 describieron, por primera vez, la aparición de una nueva asociación

de espermatozoides que denominaron "roseta". Estas rosetas consisten en aproximadamente una docena de espermatozoides unidos por la cabeza y con sus colas libres. Luego de unos minutos de incubación en el medio de cultivo, los espermatozoides uno a uno comienzan a desprenderse dando como resultado la desorganización de la roseta. Mediante técnicas de microscopía electrónica de transmisión y de barrido describieron las características morfológicas de las rosetas. También observaron la presencia de la glicoproteína DE dentro del material denso que une las cabezas de los espermatozoides (Fornés & Burgos, 1994). Algunos años más tarde, comunicamos la existencia de un fenómeno similar en el ratón -*Mus musculus*- al que denominamos también rosetas (Monclus *et al.*, 2007). Se observaron muchas similitudes con las rosetas de rata en cuanto a su morfología y presencia dentro de las regiones distales del lumen del epidídimo. Posteriormente trabajando con ratas Wistar (*Rattus norvegicus*), analizamos el mecanismo de formación rosetas *in vitro* mediante un ensayo de re asociación (Monclus *et al.*, 2010). Luego, pudimos aislar los factores involucrados en la conjugación y por sucesivas cromatografías identificamos una proteína presente en el fluido epididimario de la región caudal que participa en este proceso de asociación de espermatozoides *in vitro*. La proteína fue identificada como Serpina 1F, también denominada PEDF (Pigment Epithelium Derived Factor) (Broadhead *et al.*, 2010).

Por otra parte, en cuanto a la movilidad de los conjugados de espermatozoides, estos se comportan de manera diferente según la especie bajo estudio. En los roedores de laboratorio se pudo determinar que las rosetas no se desplazan a mayor velocidad que los espermatozoides aislados, por lo cual no puede inferirse que representen una posible ventaja en caso de competencia espermática. En tanto que para los roedores silvestres (Moore *et al.*, 2002) se describió que los conjugados (trenes) tienen una velocidad mayor que los espermatozoides aislados. Por la tanto en los casos de competencia espermática la conjugación de espermatozoides puede ofrecer una ventaja respecto de otros machos, permitiéndole a los conjugados más veloces aproximarse más rápidamente al ovocito. En el caso de rata y ratón, el posible beneficio que representa la formación de rosetas estaría relacionado con la pro-

tección de los espermatozoides durante su almacenamiento en el cauda epididimario y o frente a la agresión del medio en el tracto reproductor femenino (Martan & Shepherd, 1973; Birkhead *et al.*, 1993).

Este trabajo se enfoca sobre el destino de los EC dentro del tracto femenino en rata, que hasta el momento se desconocía. No hay referencias previas respecto a la presencia de rosetas en la zona de fecundación (tercio externo de los oviductos) y su comportamiento en proximidades del ovocito.

MATERIAL Y MÉTODO

Reactivos y soluciones. Todos los reactivos fueron adquiridos a la firma Sigma-Aldrich, salvo algunos casos en los cuales se especifica en el texto el proveedor. El PBS utilizado (ClNa 0,138 M - ClK 0,027 M - Phosphate buffered saline 0,01M, pH 7,4) se preparó a partir de un sobre de P-3813 (Sigma) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La Solución de Bouin consistió en Acido pícrico 150 mL -Solución acuosa saturada-, Formaldehido 50 mL y Acido acético glacial 10 mL.

Animales, ciclado y apareamiento. Los animales utilizados en este trabajo (ratas Wistar) provienen del Bioterio del Instituto de Histología y Embriología de Mendoza, donde son mantenidos de acuerdo con la guía: *The Guiding Principles in the Care and Use of Animal of the US National Institute of Health*. Los procedimientos realizados fueron presentados oportunamente y se encuentran aprobados por el comité de CICUAL (Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio) de la FCM, Universidad Nacional de Cuyo (<http://fcm.uncuyo.edu.ar/cicual>).

Se utilizaron ratas hembras adultas y se mantuvieron con un ritmo de luz y oscuridad de 12 h, pero invertidos con respecto al ciclo día y noche natural de nuestra región geográfica. Esto tiene por finalidad que el momento de apareamiento, que en esta especie es en las primeras horas de oscuridad coincida con el trabajo diario en el laboratorio. Estas hembras fueron cicladas diariamente para determinar el ciclo estral. Para

ello con una pipeta con bulbo plástico tipo Pasteur de punta delgada y roma se introdujeron 50 μ L de PBS tibio en la vagina de las ratas inmovilizadas por sujeción manual. En el mismo acto se retiró la gota conteniendo el flujo vaginal. Este flujo, con células vaginales descamadas, permitió determinar el momento del ciclo. Aquellas hembras en proestro se separaron en cajas individuales y luego se introdujo un macho adulto y de fertilidad comprobada para el apareamiento. Este acto se realizó en cámara con luz roja (oscuridad visual para los animales) y bajo observación directa se determinó el fin del apareamiento. Los machos fueron retirados de las jaulas y las hembras fueron chequeadas de poseer espermatozoides en la vagina mediante el procedimiento arriba descrito o la presencia de tapón vaginal que certificara la eyaculación de los machos. Luego de tiempos variables desde la cópula se sacrificaron las hembras en cámara de Dióxido de Carbono para una eutanasia aprobada por el CICUAL.

Separación de oviductos y verificación de cumulus intra tubáricos. Inmediatamente luego de la eutanasia se separaron el útero, las tubas y los ovarios colocándolos en cajas tipo Petri (60 mm, Nunc®) conteniendo 2 ml de PBS para evitar la desecación y a 37 °C sobre platina térmica manteniendo la temperatura constante. Luego, bajo lupa Nikon modelo TMS, con transiluminación se procedió a separar con tijeras el útero del resto del tracto femenino obteniéndose las trompas y ovario. A mayor aumento se determinó la presencia de los complejos cumulus - ovocito. A continuación, se separaron las trompas a cajas de Petri más pequeñas (Nunc® 35 mm) conteniendo PBS y se cortó la zona dilatada de las trompas que contenía los cumulus mediante aguja (40/8 Terumo®) permitiendo el escape del contenido: fluido tubárico, cumulus y espermatozoides. A mayor aumento aún bajo lupa se observó que hubiese presencia de cumulus en el material fluvente. A este conjunto se le adicionó 100 μ l de fijador Bouin para preservar las estructuras presentes. Luego se trasladó la caja y el material a un microscopio invertido WPI (World Precision Instruments Inc.). Se realizaron las observaciones y fotografió el material del fluido tubárico a 2 h y 4 h de la copulación. En otros experimentos el material que fluyó de la trompa se fijó, se aspiró con pipeta tipo Pasteur similar a las descriptas previamente y transfirió a porta ob-

jetos. Inmediatamente se colocó un cubre objeto cuyos bordes poseían un fino cordón de vaselina sólida (Ewe®) que al colocarlo sobre la muestra (con la vaselina hacia el porta) genera una cámara y evita la desecación. Estas preparaciones se observaron en microscopio de campo claro con DIC (Leitz, upright) a mayor aumento.

RESULTADOS

Verificación de cumulus intra tubáricos. Las trompas obtenidas presentaron en su mayoría complejos cumulus ovocitarios que por transiluminación se pudieron detectar en zonas dilatadas del tercio distal de las trompas aisladas (Fig. 1a). Estas zonas a mayor aumento permitían inferir por la opacidad interna la presencia de cumulus (Figs. 1b y 1c).

Contenido tubárico a 2 h de la cópula. Bajo lupa y luego de lacerar las trompas – en las zonas dilatadas – se produjo la salida del contenido comprobándose la presencia de varios com-

plejos cumulus - ovocito (Fig. 1d, flechas). Estos complejos correspondieron a complejos cumulus - ovocito inmaduros porque sus células foliculares estaban abigarradas sobre la zona pelúcida a las 2 h del apareamiento y luego del proestro (Fig. 2 a, asteriscos). En la zona de corte también salió el contenido de la inmediata vecindad de los complejos y se pudieron observar EC (Fig. 2, b y c correspondiente a un mayor aumento del recuadro de la Fig. 2a).

Contenido tubárico a 4 h de la cópula. La preparaciones en cámaras permitieron a mayor aumento observar los cumulus y conjugados de espermatozoides obtenidos de la región ampular de la trompa. A mayor aumento se pudieron observar EC de menor número de espermatozoides por conjugado (Fig. 3a, flecha) en comparación con los observados en la zona distal del epidídimo. Estos EC se encontraron en la vecindad de cúmulos inmaduros ("rosetas" típicas de espermatozoides; Fig. 3a, b y c flecha). En tanto que a mayor aumento entre las células foliculares (Fig. 3b y d, asteriscos) se observaron espermatozoides individuales atravesando el cumulus.

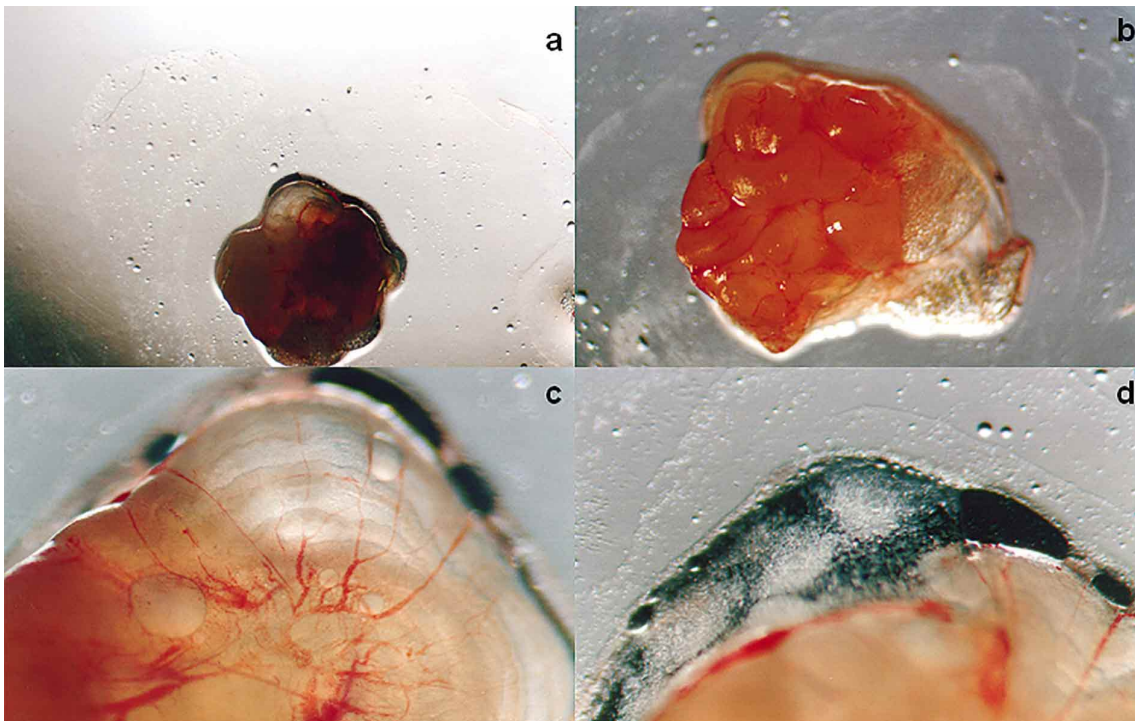


Fig. 1. Micrográficas de trompas de rata y su contenido a baja magnificación a dos horas del apareamiento. Se observan zonas dilatadas del tercio distal (a; 40X). A mayor aumento, se aprecia por opacidad la presencia de cumulus ovocitarios (b; 100X y c; 250X). Luego de la salida del contenido tubárico se observan varios complejos cumulus - ovocito (d, flechas; 400X).

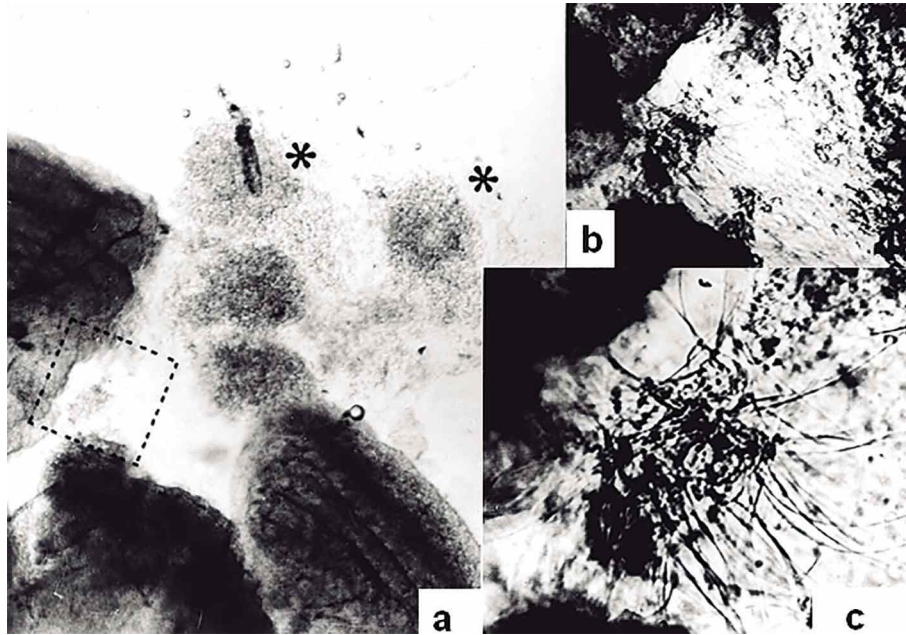


Fig. 2. Micrografías del contenido tubárico a mayor aumento luego de 2 horas del apareamiento. Se aprecian numerosos cumulus ovocitarios inmaduros (a, asteriscos; 250X). En las proximidades de los cumulus se observan espermatozoides conjugados -rosetas- (b; 450X y c; 650X). Las dos últimas imágenes corresponden a una magnificación de la zona recuadrada en la Figura 1a.

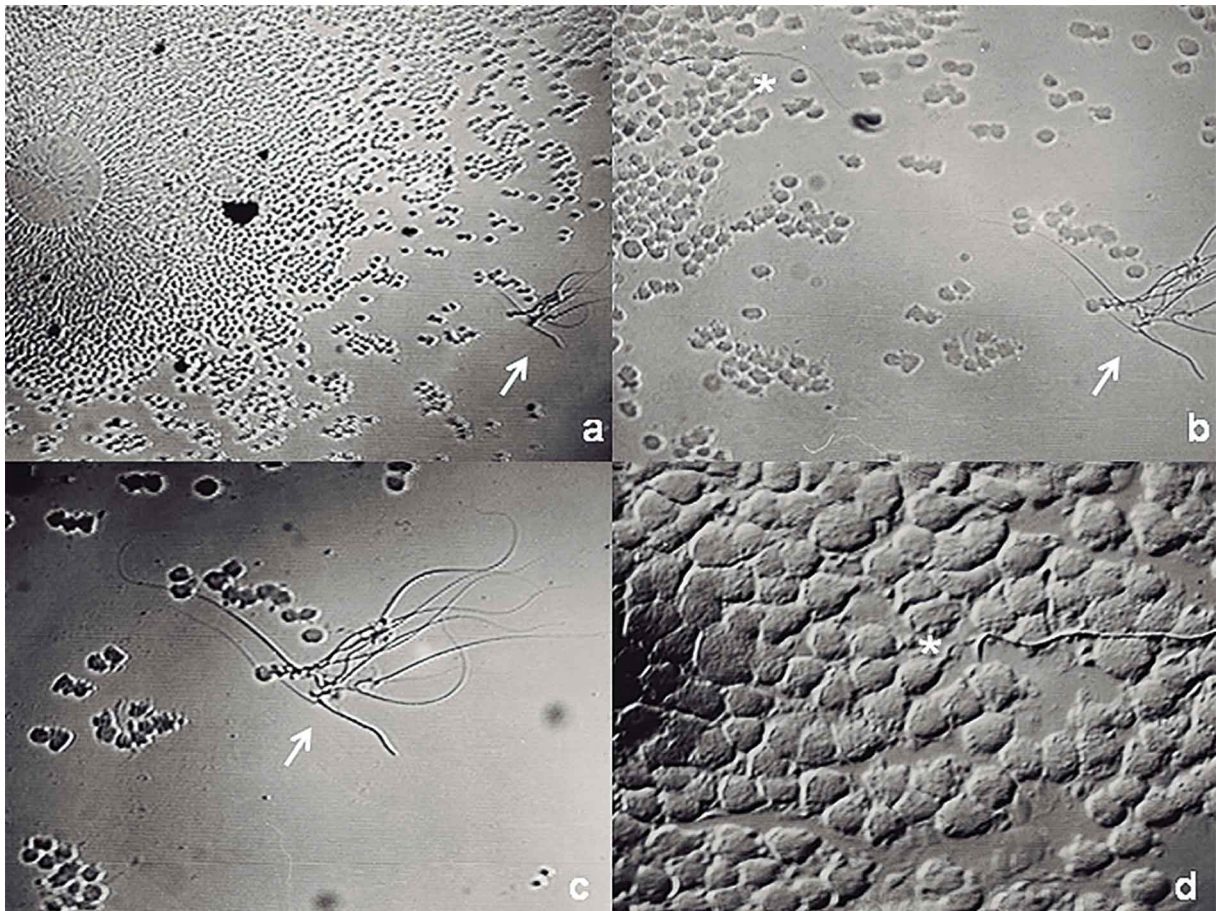


Fig. 3. Micrografías del contenido tubárico a 4 horas de la cópula, obtenidas con alta magnificación. Se observa un menor número de espermatozoides por conjugado (a, flecha; 250X). Los conjugados se sitúan en la vecindad de los cumulus inmaduros (a, 250X; b, 450X y c, flecha, 450X). Entre las células foliculares se observan espermatozoides individuales atravesando el cumulus (b y d, asteriscos).

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se avanzó en la determinación de la presencia de conjugados de espermatozoides epididimarios (rosetas) de rata en las trompas. Estos conjugados estaban presentes luego de 2 h de la cópula dentro de las trompas. Tanto los complejos cumulus - ovocito como los conjugados de espermatozoides se localizaron al mismo tiempo en la zona de fertilización. Es de notar que los cumulus ovocitarios mostraron células foliculares compactadas, indicando que estaban aún inmaduros. No se observó a estos tiempos espermatozoides individuales. En tanto que a las 4 h se observó una moderada expansión del cumulus, como así también espermatozoides individuales entre las células foliculares más periféricas.

Como se mencionó en la introducción, la velocidad de desplazamiento de los conjugados de espermatozoides es controversial para diferentes autores. En especies como el ratón ciervo (Fisher & Hoekstra, 2010), ratón de campo (Moore *et al.*), equidna (Djakiew & Jones, 1983; Jones *et al.*, 2007), marsupiales americanos (Taggart *et al.*, 1993) se observó que los conjugados de espermatozoides se desplazan a mayor velocidad que los espermatozoides aislados. Esto supone una probable una ventaja reproductiva en sistemas de apareamiento con alta probabilidad de competencia espermática entre espermatozoides de distintos machos. Este aumento en la velocidad de desplazamiento puede deberse a la mayor fuerza de empuje de los espermatozoides conjugados (sinergia) respecto de las células aisladas, incluso en un medio viscoso (Moore & Taggart, 1995; Moore *et al.*).

Pero no es menos importante el hecho de que durante ascenso de los espermatozoides en el tracto reproductor femenino intervienen otros mecanismos. A pesar de que millones de espermatozoides se depositan en el tracto femenino durante el coito o la inseminación artificial, sólo unos miles atraviesan la unión útero-tubárica (Suarez *et al.*, 1997). Algunos espermatozoides aislados alcanzan la ampolla tubárica rápidamente, pero no necesariamente son los que participan en la fertilización del ovocito (Hunter & Wilmut, 1983; Overstreet &

Cooper, 1978; Overstreet *et al.*, 1978). Una segunda población de espermatozoides alcanza el itsmo varias horas después y quedan allí retenidos. Durante este periodo, los espermatozoides toman contacto con las células ciliadas del epitelio del itsmo formando lo que se denomina "reservorio espermático oviductal" (Suarez, 2002; Töpfer-Petersen *et al.*, 2002). Este reservorio regula la liberación de un número adecuado de espermatozoides capacitados, en el momento fisiológico óptimo para garantizar una adecuada fertilización por un solo espermatozoide. Por ello podríamos pensar que en rata el transporte es relativamente rápido y los conjugados llegan antes que los espermatozoides individuales y que estos luego se desensamblan para que sólo uno penetre al ovocito. Por otra parte, es ampliamente conocida la influencia del fenómeno de quimiotaxis en el desplazamiento espermático. Gradientes de progesterona, del orden de los picogramos, regulan numerosos procesos fisiológicos como el desplazamiento, el "priming" y la reacción acrosomal en espermatozoides de mamíferos (Uñates *et al.*, 2014; Guidobaldi *et al.*, 2012). El hecho de que al desensamblarse los conjugados en la trompa y liberar espermatozoides progresivamente, estos se encuentren en contacto inmediatamente con el cumulus ovocitario y permitiría que sustancias como progesterona involucradas en quimiotaxis, capacitación y reacción acrosomal le den herramientas a los espermatozoides para fertilizar al ovocito (Teves *et al.*, 2006; Guidobaldi *et al.*, 2008; Pietrobon *et al.*, 2005).

Otra función propuesta para la conjugación espermática es preservar la integridad y funcionalidad de los espermatozoides. Es deseable evitar una reacción acrosomal anticipada, lo que resultaría en la pérdida de capacidad de fertilización para el espermatozoide en cuestión. Los espermatozoides representan un caso excepcional en el que una célula cumple su función en un organismo desconocido y por lo tanto, está expuesto a un medio hostil en el tracto femenino (Birkhead *et al.*). Este papel protector se ha sugerido en el oposum (Bedford *et al.*, 1984), loris (Phillips & Bedford, 1987), roedores (Fornes & Burgos, 1994; Immler *et al.*, 2007),

y conejillos de indias (Tung *et al.*, 1980; Cooper *et al.*, 2000; Yanagimachi & Mahi, 1976). Además, se propuso también la posible protección contra la fagocitosis por los polimorfonucleares en el tracto genital femenino para conejillos de indias (Martan & Shepherd).

En conclusión la presencia de conjugados de espermatozoides de rata en el fluido tubárico vecino a los cumulus ovocitarios indica que estos EC son capaces de alcanzar la zona de fertilización pero luego deben disociarse para que un solo espermatozoide avance entre las células foliculares hacia el ovocito.

MONCLUS, M. Á. & FORNÉS, M. W. Sperm conjugates (association of several sperm in the epididymis) reach zone fertilization in rats, but fertilizes only one sperm. *Int. J. Med. Surg. Sci.*, 2(4):663-670, 2015.

SUMMARY: Mammalian sperm conjugation phenomenon occurs both in the epididymis or post ejaculation. Sperm conjugates consist of tens to hundreds of partner sperm. The combination of sperm is found in the ejaculate of some species but it is unknown if the female tract amount reaching the area of ??fertilization (distal third of the tubes) and if the dissociation before or during interaction with the oocyte cumulus. Various mechanisms have been proposed by which the formation of these structures favor fertilization: a. increased speed of scrolling synergies with individual sperm, particularly in cases of sperm, b competition. conjugated sperm protection against the hostile environment, c. prevention of early acrosome reaction, among others. Our group described this phenomenon in rat and mouse rosettes and proposed calling them a possible associative mechanism. These conjugates consist of groups of sperm joined at their heads and with their free scourges in no less than 10 cells. They were described within the lumen of the region of the cauda epididymis, but not in more proximal sites, suggesting that sperm join together must have matured and made contact with factors of epididymal fluid. To know what the final destination of the spermatid conjugates we studied the presence of male gametes conjugate or in the female genital tract after ejaculation rat.. Samples of the contents of the tubes obtained different times allowed us to observe mating post near the complex conjugates cumulus - oocyte. But only individual sperm between the cumulus cells were observed. This suggests that the conjugates after reaching sperm fertilization area are separated into individual sperm.

KEY WORDS: Sperm; Oviduct; Cumulus Fertilization.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bedford, J. M.; Rodger, J. C. & Breed, W. G. Why so many mammalian spermatozoa--a clue from marsupials? *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 221(1223):221-33, 1984.
- Birkhead, T. R.; Møller, A. P. & Sutherland, W. J. Why do Females Make it so Difficult for Males to Fertilize their Eggs? *J. Theor. Biol.*, 161(1):51-60, 1993.
- Broadhead, M. L.; Becerra, S. P.; Choong, P. F. & Dass, C. R. The applied biochemistry of PEDF and implications for tissue homeostasis. *Growth Factors*, 28(4):280-5, 2010.
- Cooper, T. G.; Weydert, S.; Yeung, C. H.; Künzl, C. & Sachser, N. Maturation of epididymal spermatozoa in the nondomesticated guinea pigs *Cavia aperea* and *Galea musteloides*. *J. Androl.*, 21(1):154-63, 2000.
- Djakiew, D. & Jones, R. C. Sperm maturation, fluid transport, and secretion and absorption of protein in the epididymis of the echidna, *Tachyglossus aculeatus*. *J. Reprod. Fertil.*, 68(2):445-56, 1983.
- Fawcett, D. W. & Hollenberg, R. D. Changes in the acrosome of the guinea pig spermatozoa during passage through the epididymis. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, 60:276-92, 1963.
- Fisher, H. S. & Hoekstra, H. E. Competition drives cooperation among closely related sperm of deer mice. *Nature*, 463(7282):801-3, 2010.
- Fornes, M. W. & Burgos, M. H. Epididymal glycoprotein involved in rat sperm association. *Mol. Reprod. Dev.*, 38(1):43-7, 1994.
- Fornes, M. W. & Burgos, M. H. Sperm association in the rat epididymis. *Microsc. Electron. Biol. Celular*, 14(2):115-29, 1990.
- Guidobaldi, H. A.; Teves, M. E.; Uñates, D. R.; Anastasia, A. & Giojalas, L. C. Progesterone from the cumulus cells is the sperm chemoattractant secreted by the rabbit oocyte cumulus complex. *PLoS One*, 3(8):e3040, 2008.
- Guidobaldi, H. A.; Teves, M. E.; Uñates, D. R. & Giojalas, L. C. Sperm transport and retention at the fertilization site is orchestrated by a chemical guidance and oviduct movement. *Reproduction*, 143(5):587-96, 2012.
- Higginson, D. M. & Pitnick, S. Evolution of intra-ejaculate sperm interactions: do sperm cooperate? *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, 86(1):249-70, 2011.
- Hunter, R. H. F. & Wilmut, I. The rate of functional sperm transport into the oviducts of mated cows. *Anim. Reprod. Sci.*, 5(3):167-73, 1983.

- Immler, S.; Moore, H. D. M.; Breed, W. G. & Birkhead, T. R. By hook or by crook? Morphometry, competition and cooperation in rodent sperm. *PLoS One*, 2(1):e170, 2007.
- Jones, R. C.; Dacheux, J. L.; Nixon, B. & Ecroyd, H. W. Role of the epididymis in sperm competition. *Asian J. Androl.*, 9(4):493-9, 2007.
- Martan, J. & Shepherd, B. A. Spermatozoa in rouleaux in the female guinea pig genital tract. *Anat. Rec.*, 175(3):625-9, 1973.
- Monclus, M. A.; Cesari, A.; Cabrillana, M. E.; Borelli, P. V.; Vincenti, A. E.; Burgos, M. H. & Fornés, M. W. Mouse sperm rosette: assembling during epididymal transit, *in vitro* disassemble, and oligosaccharide participation in the linkage material. *Anat. Rec. (Hoboken)*, 290(7):814-24, 2007.
- Monclus, M. A.; Andreina, C.; Cabrillana, M. E.; Lancellotti, T. E.; Rensetti, D. E.; Clementi, M. A.; Boarelli, P. V.; Vincenti, A. E. & Fornés, M. W. Protein fraction isolated from epididymal fluid re-associates sperm *in vitro*: possible role of serpins in rat rosettes assembly. *Mol. Reprod. Dev.*, 77(5):410-9, 2010.
- Moore, H.; Dvoráková, K.; Jenkins, N. & Breed, W. Exceptional sperm cooperation in the wood mouse. *Nature*, 418(6894):174-7, 2002.
- Moore, H. D. & Taggart, D. A. Sperm pairing in the opossum increases the efficiency of sperm movement in a viscous environment. *Biol. Reprod.*, 52(4):947-53, 1995.
- Overstreet, J. W. & Cooper, G. W. Sperm transport in the reproductive tract of the female rabbit: II. *Biol. Reprod.*, 19(1):115-32, 1978.
- Phillips, D. M. & Bedford, J. M. Sperm-sperm associations in the loris epididymis. *Gamete Res.*, 18(1):17-25, 1987.
- Pietrobon, E. O.; Soria, M.; Domínguez, L. A.; Monclus, M. A. & Fornés, M. W. Simultaneous activation of PLA2 and PLC are required to promote acrosomal reaction stimulated by progesterone via G-proteins. *Mol. Reprod. Dev.*, 70(1):58-63, 2005.
- Pitnick, S.; Hosken, D. J.; Birkhead, T. R. *Sperm morphological diversity*. In: Birkhead, T. R.; Hosken, D. J. & Pitnick, S. (Eds.). *Sperm Biology, an evolutionary perspective*. San Diego, Academic Press, 2009. pp.130-1.
- Radigue, C.; Soufir, J. C.; Couvillers, M. L.; Dantec, M. C. & Folliot, R. Early effects of gossypol on the testis and epididymis in the rat. *Reprod. Nutr. Dev.*, 28(5):1329-38, 1988.
- Simeone, F. A. & Young, W. C. A study of the function of the epididymis. IV. The fate of non-ejaculated spermatozoa in the genital tract of the male Guinea pig. *J. Exp. Biol.*, 28:163-75, 1931.
- Suarez, S. S.; Brockman, K. & Lefebvre, R. Distribution of mucus and sperm in bovine oviducts after artificial insemination: the physical environment of the oviductal sperm reservoir. *Biol. Reprod.*, 56(2):447-53, 1997.
- Suarez, S. S. Formation of a reservoir of sperm in the oviduct. *Reprod. Domest. Anim.*, 37(3):140-3, 2002.
- Taggart, D. A.; Johnson, J. L.; O'Brien, H. P. & Moore, H. D. Why do spermatozoa of American marsupials form pairs? A clue from the analysis of sperm-pairing in the epididymis of the grey short-tailed opossum, *Monodelphis domestica*. *Anat. Rec.*, 236(3):465-78, 1993.
- Teves, M. E.; Barbano, F.; Guidobaldi, H. A.; Sanchez, R.; Miska, W. & Giojalas, L. C. Progesterone at the picomolar range is a chemoattractant for mammalian spermatozoa. *Fertil. Steril.*, 86(3):745-9, 2006.
- Töpfer-Petersen, E.; Wagner, A.; Friedrich, J.; Petrunkina, A.; Ekhlesi-Hundrieser, M.; Waberski, D. & Drommer, W. Function of the mammalian oviductal sperm reservoir. *J. Exp. Zool.* 292(2):210-5, 2002.
- Tung, K. S.; Okada, A. & Yanagimachi, R. Sperm autoantigens and fertilization. I. Sperm autoantigens and fertilization. I. Effects of antisperm autoantibodies on Rouleaux formation, viability, and acrosome reaction of guinea pig spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 23(4):877-86, 1980.
- Uñates, D. R.; Guidobaldi, H. A.; Gatica, L. V.; Cubilla, M. A.; Teves, M. E.; Moreno, A. & Giojalas, L. C. Versatile action of picomolar gradients of progesterone on different sperm subpopulations. *PLoS One*, 9(3):e91181, 2014.
- Yanagimachi, R. & Mahi, C. A. The sperm acrosome reaction and fertilization in the guinea-pig: a study *in vivo*. *J. Reprod. Fertil.*, 46(1):49-54, 1976.

Dirección para Correspondencia:
María Ángeles Monclus PhD. o Miguel W. Fornés
Instituto de Histología y Embriología.
Área de Histología y Embriología.
Departamento de Morfología y Fisiología.
Facultad de Ciencias Médicas, Centro Universitario
Universidad Nacional de Cuyo
Av. del Libertador 80, Parque Gral. San Martín
Casilla de Correo 56
Mendoza 5500
ARGENTINA

Email: mmonclus@fcm.uncu.edu.ar
mfornes@fcm.uncu.edu.ar

Recibido : 07-10-2015
Aceptado: 27-11-2015