



UNIVERSIDAD DE ANTOFAGASTA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA DE BIOQUÍMICA

**<< EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
MITOCONDRIAL DURANTE LA
CAPACITACIÓN DEL
ESPERMATOZOIDE DE RATA >>**

TESIS DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE BIOQUÍMICO

JOVANY ROBERTO MALDONADO MICHEA

PROFESOR GUÍA:
DRA. LIDIA ZÚÑIGA CÓNDOR
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
UNIVERSIDAD DE ANTOFAGASTA
ANTOFAGASTA, MAYO 2019



**UNIVERSIDAD DE ANTOFAGASTA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA DE BIOQUÍMICA**

<< EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL DURANTE LA CAPACITACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE DE RATA >>

TESIS DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE BIOQUÍMICO

JOVANY ROBERTO MALDONADO MICHEA

**PROFESOR GUÍA:
DRA. LIDIA ZÚÑIGA CÓNDOR
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
UNIVERSIDAD DE ANTOFAGASTA
ANTOFAGASTA, MAYO 2019**



**UNIVERSIDAD DE ANTOFAGASTA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA DE BIOQUÍMICA**

ACTA DE NOTA DE TESIS

<< EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
MITOCONDRIAL DURANTE LA
CAPACITACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE DE
RATA >>

Se informa que la tesis para optar al título de Bioquímico, presentada por el estudiante

JOVANY ROBERTO MALDONADO MICHEA

Ha sido aprobada por la comisión de evaluación de la tesis como requisito para optar al título de Bioquímico, en la defensa de tesis rendida el día ____ de _____ del 2019.

Director de tesis:

Dra. Lidia Zúñiga Córdor

Comisión de evaluación de tesis:

Dr.

Dr.

I. AGRADECIMIENTOS

II. Abreviaturas

°C	Grados Celsius.
ATP	Adenosin trifosfato.
Bcl-2	Familia de proteínas de células B del linfoma 2.
BMP8B	Proteína morfogenética ósea 8B.
BSA	Albumina sérica de bovino.
BWW	Medio Biggers Whitten & Whittingham.
Ca⁺²	Catión divalente de Calcio.
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico.
CatSper	Canal de calcio del espermatozoide.
CGP	Células germinales primordiales.
CoQ	Coenzima Q.
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
FITC	Isotiocianato de fluorescencia.
g	Gramos.
h	Hora (s).
HCl	Ácido clorhídrico.
kDa	Kilo Dalton(s).
mA	Mili Ampere (s).
MAE	Membrana acrosomal externa.

MC	Medio capacitante.
mDNA	Acido desoxirribonucleico mitocondrial.
min	Minuto
mL	Mililitro
MNC	Medio no capacitante.
MOMP	Permeabilización mitocondrial de la membrana externa.
MTred	MitoStatus-Red (tinción mitocondrial).
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido.
NBC	Cotransportador Na^+ / HCO_3^- .
nm	Nanómetro (s).
PBS	Tampón fosfato salino.
pH	- logaritmo de la $[\text{H}^+]$.
PKA	Proteína quinasa A.
pSPKA	Anticuerpo anti-sustratos fosforilados de proteína quinasa A.
pTyr	Residuo de tirosina fosforilada.
RA	Reacción del acrosoma.
RNA	Ácido ribonucleico.
ROS	Especie (s) reactiva (s) del Oxígeno.
rpm	Revoluciones por minuto.
rRNAs	Ácidos ribonucleicos ribosomales.
RRXS*/T*	Motivo RRX (Serina/Treonina fosforilados).
SACY	Adenil ciclasa soluble de espermatozoide.

SDS	Dodecilsulfato de sodio.
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio.
SE	Segmento ecuatorial de la cabeza del espermatozoide.
SP	Segmento principal del acrosoma.
tRNAs	Ácidos ribonucleicos de transferencia.
$\Delta\psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial.
μL	Micro Litro (s).
μM	Micro Molar.

III. ÍNDICE

III. ÍNDICE	8
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	19
1.1 ANTECEDENTES GENERALES.....	22
1.1.1 Aparato reproductor masculino	22
1.1.2 Glándulas accesorias	26
1.1.3 El espermatozoide	28
1.1.4 Marcadores de la capacitación.....	35
1.2 ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	40
1.2.1 La mitocondria en el espermatozoide de mamíferos	40
1.2.2 Actividad mitocondrial y movilidad del espermatozoide.....	42
1.2.3 Actividad mitocondrial y capacitación del espermatozoide	44
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
2.1 MATERIALES	48
2.1.1 Materiales de cirugía y microscopía	48
2.1.2 Reactivos	48
2.2 MÉTODOS.....	52
2.2.1 Animales.....	52
2.2.2 Preparación de medio Biggers Whitten & Whittingham (BWW).....	52
2.2.3 Obtención de espermatozoides	55
2.2.4 Incubación de células para obtener espermatozoides capacitados	56

2.2.5	Obtención de proteínas del espermatozoide y cuantificación	57
2.2.6	Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	59
2.2.7	Western blot.....	60
2.2.8	Fijación de espermatozoides	61
2.2.9	Citometría en célula fijada.....	62
2.2.10	Citometría en célula viva.	65
2.2.11	Clasificación de células (<i>sorting</i>).....	67
2.2.12	Inmunofluorescencia indirecta.....	70
CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN		74
3.1	RESULTADOS	75
3.1.1	Objetivo 1: Determinar el tiempo de incubación necesario para obtener espermatozoides capacitados	75
3.1.2	Objetivo 2: Caracterizar la actividad mitocondrial en diferentes tiempos de incubación en MNC y MC	80
3.1.3	Objetivo 3: Establecer una relación entre la actividad mitocondrial y la capacitación del espermatozoide.....	90
3.2	DISCUSIÓN.....	95
CAPÍTULO 4: CONCLUSIONES		99
4.1	RESUMEN DE RESULTADOS.....	100
5	APÉNDICES	101
5.1	SOLUCIONES.....	102
5.1.1	Soluciones para el aislamiento y cuantificación de proteínas	102
5.1.2	Soluciones para la inmunofluorescencia	102
5.1.3	Soluciones para SDS-PAGE	103

5.1.4	Preparación de geles	104
5.1.5	Tampón de electroforesis y electrotransferencia.....	105
5.1.6	Soluciones para <i>western blot</i>	105
5.1.7	Soluciones para revelar los films expuestos a luminiscencia	106
5.2	PROCEDIMENTOS	107
5.2.1	Análisis por citometría.....	107
6	BIBLIOGRAFÍA	109

IV. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. El sistema reproductor masculino.....	22
Figura 2. Corte transversal del testículo.....	24
Figura 3. Representación esquemática de los principales tipos de células en el epidídimo.	25
Figura 4. Vista posterior de las glándulas accesorias del hombre.....	28
Figura 5. Características generales del espermatozoide de mamífero.....	30
Figura 6. Distribución de regiones y membranas en una cabeza falciforme del espermatozoide.....	30
Figura 7. Imágenes comparativas de los movimientos de un espermatozoide de mono activado (A) e hiperactivado (B).....	32
Figura 8. Bases moleculares de los eventos tempranos y tardíos asociados con la capacitación de los espermatozoides.....	35
Figura 9. Patrones de movimiento activado e hiperactivado de espermatozoides en diferentes especies.....	36
Figura 10. Reacción del acrosoma en el espermatozoide humano.....	39
Figura 11. Esquema de la cadena transportadora de electrones en la membrana mitocondrial interna.....	41
Figura 12. Fuerzas flagelares activadas del espermatozoide de mono.....	43
Figura 13. Microfotografía de espermatozoide humano teñidos con marcadores mitocondriales.....	44
Figura 14. Soluciones <i>stock</i> de medio no capacitante (izquierda), y medio capacitante (derecha).	54
Figura 15. Protocolo para la obtención de espermatozoides, y la posterior cuantificación de células con la ayuda de un hemocitómetro.....	56
Figura 16. Curva de calibración para la cuantificación de proteínas totales de espermatozoides.....	58

Figura 17. Protocolo de fijación de espermatozoides utilizando el kit Cytifix/Cytoperm™.	61
Figura 18. Kit cytofix/cytoperm™ de BD Biosciences.	62
Figura 19. Rotor utilizado para la incubación de las muestras tratadas con el anticuerpo primario y secundario.	64
Figura 20. Protocolo para la detección de residuos de tirosina fosforilada en las proteínas del espermatozoide, por citometría de flujo.	65
Figura 21. Protocolo para determinación de la actividad mitocondrial, por citometría de flujo en célula viva.	67
Figura 22. Protocolo para la selección de subpoblaciones de espermatozoides con diferente $\Delta\psi_m$.	69
Figura 23. Tubos para concentrar los espermatozoides después del <i>sorting</i> .	70
Figura 24. Protocolo para la concentración y extendido de espermatozoides <i>post-sorting</i> .	72
Figura 25. Protocolo para la inmunofluorescencia de los espermatozoides seleccionados <i>post-sorting</i> .	73
Figura 26. Fosforilación en residuos tirosina de espermatozoides incubados en MNC y MC.	76
Figura 27. Histogramas del porcentaje de espermatozoides que presentan proteínas fosforiladas en sus residuos de tirosina, en MNC y MC.	77
Figura 28. <i>Dot-plots</i> del porcentaje de espermatozoides que presentan proteínas fosforiladas en sus residuos de tirosina, en MNC y MC, a las 2h de incubación.	78
Figura 29. Porcentajes de espermatozoides pTyr- y pTyr+ después de su incubación en MNC y MC.	79
Figura 30. Población parental (P1) detectada al tiempo 0,5 h.	81
Figura 31. Eventos agrupados en subpoblaciones con diferente $\Delta\psi_m$ de la muestra de espermatozoides incubados con MTred en MC para el tiempo 0,5 h.	83
Figura 32. El MC aumenta el número de espermatozoides en la subpoblación A3 (histograma amarillo).	84

Figura 33. Histogramas del número de espermatozoides de cada subpoblación v/s intensidad de fluorescencia, a lo largo del tiempo de incubación (de 0,5 a 6,5 h), en MNC y MC.	86
Figura 34. Distribución porcentual de las subpoblaciones con diferente $\Delta\psi_m$ durante la capacitación.	87
Figura 35. Distribución porcentual de las subpoblaciones de espermatozoides con diferente $\Delta\psi_m$, expuestos a diferentes dosis de nigericina.	89
Figura 36. Microfotografías de espermatozoides marcados con anticuerpo anti-pTyr, obtenidas con el microscopio de fluorescencia.	91
Figura 37. Porcentaje de espermatozoides pTyr+ presentes en cada subpoblación de espermatozoides, a las 4,5 h de incubación.	92
Figura 38. Microfotografías de espermatozoides marcados con anticuerpo anti-pSPKA, obtenidas con el microscopio de fluorescencia.	93
Figura 39. Porcentajes de espermatozoides pSPKA+, presentes en cada subpoblación a las 4,5 h de incubación.	94
Figura 40. Dot-plot de muestra de sangre, en el que se muestran diferentes tipos de células sanguíneas.	108

V. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cálculo de la concentración de proteínas totales de obtenidas en un ensayo.....	59
Tabla 2. Volúmenes de reactivos usados para la detección de espermatozoides pTyr+ por citometría de flujo.....	63
Tabla 3. Porcentajes de todos los eventos representativos de las cuatro subpoblaciones, relativos a P1.....	84

VI. RESUMEN

La mitocondria provee la energía para llevar a cabo varios procesos celulares que incluyen la movilidad espermática. Recientemente, se ha descrito la existencia de subpoblaciones de espermatozoides, con diferente potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), un indicador de la actividad mitocondrial. El $\Delta\psi_m$ ha sido relacionado con la movilidad y el potencial de fecundación de los espermatozoides, medido después de la fecundación *in vitro*, en diferentes especies. En la presente tesis, propusimos caracterizar el $\Delta\psi_m$ durante la capacitación del espermatozoide de rata y determinar la subpoblación que contiene a los espermatozoides con potencial capacidad fecundante. Para ello trabajamos con ratas de la cepa *Sprague-Dawley*, de 6 a 8 meses de edad. Obtuvimos espermatozoides de la cola del epidídimo en medio Biggers Whitten & Whittingham (BWW) sin bicarbonato ni BSA, medio no capacitante (MNC). Incubamos a los espermatozoides en medio capacitante (MC): BWW + 25 mM de bicarbonato + 1,5 % de BSA; y MNC por 0, 2, 4 y 6 h. Evaluamos los niveles y el número de espermatozoides que presentan proteínas fosforiladas en residuos de tirosina, por western blot y citometría de flujo; para determinar el tiempo de incubación necesario para obtener espermatozoides capacitados. Evaluamos el $\Delta\psi_m$ utilizando el kit *MitoStatus Red*TM, para caracterizar el $\Delta\psi_m$ por citometría de flujo, a diferentes tiempos de incubación en MC y MNC: 0,5; 2,5; 4,5 y 6,5 h. Caracterizamos las subpoblaciones de espermatozoides con diferente $\Delta\psi_m$ a las 4,5 h de incubación, *post sorting*, por inmunofluorescencia indirecta; para establecer una relación directa entre el $\Delta\psi_m$ y la capacitación de los espermatozoides. Los resultados de la presente tesis mostraron que, para los espermatozoides de rata, 4 h de incubación en MC fueron suficientes para obtener un adecuado número de espermatozoides capacitados. También mostraron que, existen 4 subpoblaciones de espermatozoides con diferente $\Delta\psi_m$; a las que denominamos: Súper bajo (A1), bajo (A2), alto (A3) y súper-alto (A4) $\Delta\psi_m$. La distribución porcentual de estas subpoblaciones cambió durante la capacitación. La caracterización de las subpoblaciones, a las 4,5 h de incubación en MC; mostró un enriquecimiento de espermatozoides cuyas proteínas están fosforiladas en sustratos de

PKA en la subpoblación A3 y A4, alcanzando un 77 % y 91 %, respectivamente. Hecho que no ocurre en las subpoblaciones A1 y A2, las cuales presentan sólo un 4% y 20% respectivamente.

Con los resultados obtenidos y mencionados previamente se concluye que, las subpoblaciones con alto $\Delta\psi_m$ (A3 y A4) están enriquecidas con espermatozoides capacitados a las 4,5 h de incubación en MC. Nuestros resultados muestran por primera vez evidencia de tipo causa efecto, respecto de la relación que existe entre espermatozoides con alto $\Delta\psi_m$ y su potencial capacidad fecundante.

VII. ABSTRACT

Mitochondria provide the energy to carry out several cellular processes that include sperm motility. Recently, the existence of sperm subpopulations has been described with different mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$), as an indicator of mitochondrial activity. $\Delta\psi_m$ has been related to the mobility and fertilization potential of spermatozoa, measured after *in vitro* fertilization in different species. In the present thesis, we proposed to characterize the $\Delta\psi_m$ during the capacitation of the rat sperm, and to determine the subpopulation containing the sperm with potential fertilizing capacity. To achieve this main, we worked with rats of the strain Sprague-Dawley, from 6 to 8 months of age. We obtained sperm from the tail of the epididymis in Biggers Whitten & Whittingham (BWW) culture medium, without bicarbonate or BSA, non-capacitating medium (MNC). We incubate the sperm in capacitating medium (MC): BWW + 25 mM bicarbonate + 1.5 % BSA; and MNC by 0, 2, 4 and 6 h. We evaluated the levels and number of spermatozoa that have phosphorylated proteins in tyrosine residues, by western blot and flow cytometry; to determine the incubation time necessary to obtain capacitated sperm. We evaluated the $\Delta\psi_m$ using the MitoStatus Red™ kit, to characterize $\Delta\psi_m$ by flow cytometry, at different times of incubation in MC and MNC: 0.5, 2.5, 4.5 and 6.5 h. We characterized the sperm subpopulations with different $\Delta\psi_m$ at 4.5 h of incubation, post-sorting, by indirect immunofluorescence; to establish a direct relationship between the $\Delta\psi_m$ and the capacitation of the sperm. The results of this thesis showed that, for rat sperm, 4 h of incubation in MC were sufficient to obtain an adequate number of capacitated sperm. The results also showed that, there are 4 sperm subpopulations with different $\Delta\psi_m$; which we denominate: Super low (A1), low (A2), high (A3) and super-high (A4) $\Delta\psi_m$. The distributional percentage of these subpopulations changed during the capacitation. The characterization of the subpopulations, at 4.5 h of incubation in MC; showed an enrichment of spermatozoa whose proteins are phosphorylated in PKA substrates, in subpopulation A3 and A4, reaching 77 % and 91 %, respectively. Fact that does not happen in the subpopulations A1 and A2, which present only 4 % and 20 % respectively.

With the results obtained and previously mentioned, it is concluded that subpopulations with high $\Delta\psi_m$ (A3 and A4) are enriched with capacitated sperm at 4.5 h of MC incubation. Our results show for the first time evidence of cause-effect type, with respect to the relationship between spermatozoa with high $\Delta\psi_m$ and their fertilizing capacity potential.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

La reproducción es uno de los pilares fundamentales de lo que hoy en día comprendemos como vida. Gracias a esta función, los seres vivos podemos traspasar nuestra información genética a nuevas generaciones, perpetuando en el tiempo nuestro desarrollo como comunidad, de acuerdo a la teoría de la evolución. Este mecanismo, presente en organismos tan diferentes como *Escherichia coli* (bacteria) y *Balaenoptera musculus* (ballena azul), es un factor común a todos los seres vivos; pudiéndose efectuar de forma sexual (por ejemplo, en los mamíferos) o asexual (por ejemplo, en las bacterias).

Por reproducción sexual, se comprende básicamente como la combinación de dos cromosomas parentales, es decir, el aporte de información hereditaria de un par de ejemplares de la misma especie para generar un nuevo individuo. En los mamíferos, la información genética se transmite vía células haploides (gametos), cuyo único fin es el citado anteriormente. En el hombre, las ratas, los cerdos, caballos, conejos, etc., la hembra posee ovocitos y el macho posee espermatozoides. Cada gameto tiene la particularidad de pasar por un determinado proceso de diferenciación para poder llegar a un completo desarrollo, con el único objetivo de lograr la fecundación. Estos eventos corresponden a la fase llamada gametogénesis (ovogénesis en ovocitos, y espermatogénesis en espermatozoides).

El espermatozoide (junto con el ovocito), contiene la mitad del material genético (n) del progenitor; el cual gracias al *crossing over* en la profase I y la permutación cromosómica en la metafase I de la meiosis, es diferente del material genético de la célula parental, lo cual permite que el nuevo ser en formación sea similar a ambos parentales, pero nunca idéntico. Cabe destacar también que, el espermatozoide maduro (y por sí solo), no tiene la capacidad de fecundar al ovocito; es por esto que, luego de ser depositado en el tracto reproductor femenino, pasará por una serie de cambios fisiológicos, que le conferirán la habilidad de fecundar al gameto femenino. Este proceso de preparación se llama capacitación, y ha sido objeto de estudio para comprender la interacción del gameto masculino con factores presentes en el sistema reproductor femenino, que permiten capacitarlo para la fecundación.

La célula germinal masculina, además de tener un medio mecánico de transporte (fluido seminal y uterino), debe poseer una morfología específica para su movimiento hacia

la zona en donde se lleva a cabo la fecundación. Para tal objeto, se encuentra equipado con un flagelo (en algunos animales con más de uno). Es así que, una vez depositado en el tracto reproductor femenino, es transportado gracias a contracciones del útero y particularmente por su movimiento flagelar, el cual cambia cuando se encuentra capacitado (movimiento hiperactivado). Este movimiento se caracteriza por un batido flagelar de gran amplitud, asimétrico y una trayectoria de natación circular; el cual le permite atravesar las capas del ovocito y alcanzar su membrana plasmática. Debido a esto, es que la célula necesita un mayor aporte de energía en forma de ATP; por lo que, en consecuencia, la actividad de la mitocondria juega un papel fundamental para suplir dicha demanda dentro de muchos otros propósitos más. Es importante destacar este último punto, ya que varios problemas de infertilidad (en el macho), tienen que ver con la función de la mitocondria y el movimiento del flagelo. Es por esto que comprender la relación existente entre la actividad mitocondrial y la capacitación del espermatozoide, nos permitirá proponer nuevas técnicas para la reproducción asistida, así como también nos permitirá generar nuevas líneas de investigación en la biología reproductiva.

En la presente investigación, nuestro objetivo fue caracterizar la actividad mitocondrial durante la capacitación espermática, utilizando como modelo ratas (*Rattus norvegicus*) de la cepa *Sprague Dawley*.

1.1 ANTECEDENTES GENERALES

1.1.1 Aparato reproductor masculino

En la mayoría de las especies de mamíferos, incluidos los seres humanos, los órganos del aparato reproductor masculino se dividen en: Órganos externos e internos. Los órganos reproductores externos son el escroto y el pene (ver figura 1); y los órganos reproductores internos son las gónadas que producen gametos y hormonas, las glándulas accesorias que secretan productos esenciales para la subsistencia de los espermatozoides y los conductos que los transportan junto con las secreciones glandulares (Neil A. Campbell, 2007). Cada una de estas secciones está especializada e interconectada para aportar con sus distintas funciones, desde los diferentes estadios de la espermatogénesis, hasta la eyaculación del semen en el tracto reproductor femenino, proveyendo al espermatozoide protección mecánica y una fuente de nutrientes; y asegurando también, su supervivencia en el camino a la fecundación del ovocito.

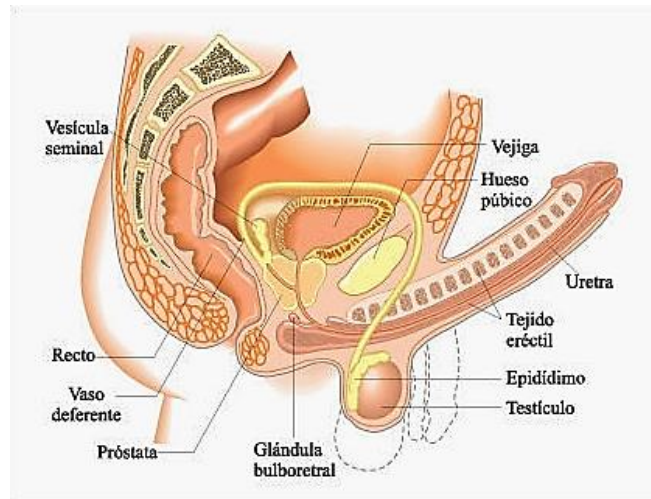


Figura 1. El sistema reproductor masculino.

El diagrama muestra el pene y el escroto antes de la erección (líneas punteadas) y durante ella (Curtis Helena, 2011).

1.1.1.1 Testículo

Los testículos se desarrollan en la cavidad abdominal, para alojarse después en una bolsa de piel llamada escroto, todo esto antes del nacimiento; quedando colgados desde la raíz del pene (David, 2011). Los testículos son una glándula par, que tiene forma ovoide (ver figura 2), y están compuestos de muchos tubos súper enrollados y rodeados por varias capas de tejido conectivo. Estos tubos se llaman túbulos seminíferos y es el lugar donde se producen los espermatozoides en forma continua, proceso denominado espermatogénesis (Curtis Helena, 2011). Las células de Leyding, distribuidas entre los túbulos seminíferos, producen testosterona entre otros andrógenos (Neil A. Campbell, 2007).

La producción de espermatozoides normales no se puede llevar a cabo con las temperaturas corporales de la mayoría de los mamíferos, por lo que los testículos de los seres humanos y muchos otros mamíferos como la rata, se mantienen fuera de la cavidad abdominal, en el escroto, que es un pliegue de la pared corporal. La zona del escroto tiene alrededor de 2 °C menos de temperatura que la cavidad abdominal. En muchos roedores los testículos vuelven a la cavidad abdominal entre las temporadas de reproducción, lo que conlleva a la interrupción del desarrollo de los espermatozoides. Algunos mamíferos, cuya temperatura corporal es lo bastante baja para permitir la maduración de los espermatozoides, como monotremas, ballenas y elefantes, conservan los testículos dentro de la cavidad abdominal de forma permanente (Neil A. Campbell, 2007).

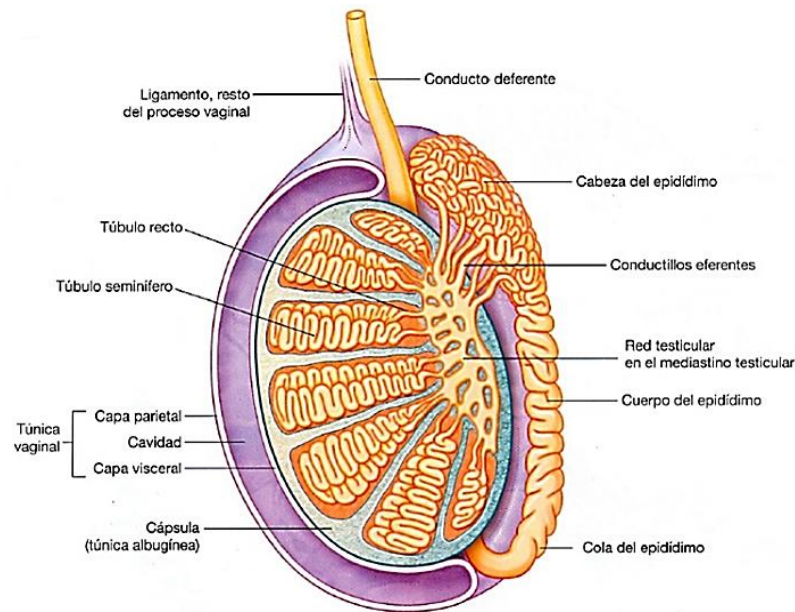


Figura 2. Corte transversal del testículo.

Se pueden observar las diferentes secciones y cavidades internas del testículo. La espermatogénesis comienza en los túbulos seminíferos, desde los que se desprenden los espermatozoides, para alojarse finalmente en el epidídimo. Imagen tomada desde la página web: <http://somosequipo5.blogspot.com/2013/09/practica-4-anatomia-del-testiculo.html>.

1.1.1.2 Túbulos seminíferos

En la presente tesis, todo el trabajo de investigación tuvo como modelo principal al espermatozoide de rata (*Rattus norvegicus*). Es por esto que describiremos las características del túbulo seminífero de esta especie.

Cada testículo de una rata *Sprague Dawley* contiene aproximadamente 30 túbulos seminíferos contorneados, con un diámetro externo de aproximadamente 250 μm y una longitud total de aproximadamente 20 m por testículo (12 m/g) y un área de superficie de 340 cm^2 (Wing & Christensen, 1982). Estas dimensiones son específicas de cada especie. Los túbulos seminíferos (ver figura 2), están compuestos por dos tipos de células: Las células germinales que producen espermatozoides, y las células de Sertoli que aportan sostén y nutrición. Una membrana basal las separa de las células de Leyding, que se

encuentran en el tejido conjuntivo entre los túbulos seminíferos. Las células germinales pasan por varias etapas de diferenciación para llegar a su forma de espermatozoides. Dicho proceso se activa en la pubertad, continuando desde allí de manera ininterrumpida. Es así como en un túbulo seminífero es posible encontrar células en todos los estadios de la espermatogénesis (Curtis Helena, 2011).

1.1.1.3 Epidídimo y ducto deferente

El epidídimo consiste en un sólo conducto altamente enrevesado (ver figura 2). Está organizado en lóbulos y termina en el conducto deferente. El transporte de espermatozoides a lo largo del conducto epididimal ocurre gracias a la capa de músculo liso de este conducto (Baumgarten H. G., 1971). Consta de varias células con diferentes funciones, las que están detalladas en la figura 3. En muchos mamíferos, el epidídimo ha sido dividido en distintas regiones, basado tanto en la estructura de su epitelio, así como en su grosor. Las regiones del epidídimo son: Caput, corpus y cauda. El corpus es el segmento más delgado y une los otros dos segmentos más anchos (Benoit, 1926). Cabe destacar que desde la cauda los espermatozoides ya son móviles (Neill, 2006).

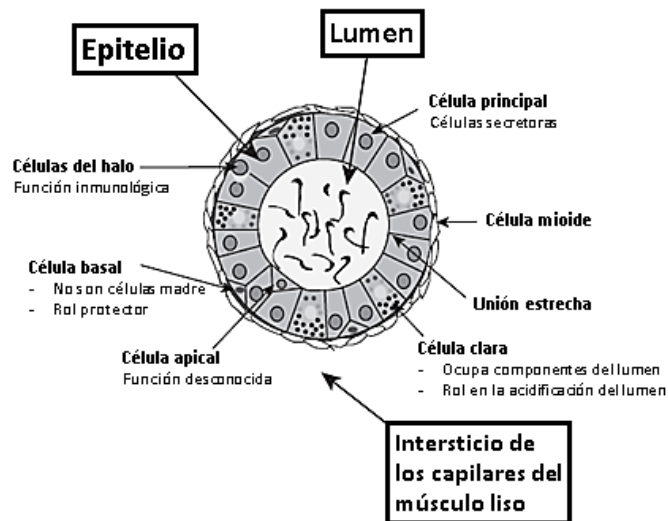


Figura 3. Representación esquemática de los principales tipos de células en el epidídimo. Se ilustra la posición relativa y la distribución de cada uno de los principales tipos de células. También se identifican las funciones principales asociadas con cada tipo de célula (Neill, 2006).

1.1.1.4 El pene

El pene está compuesto de tres cilindros de tejido eréctil esponjoso que se forma a partir de venas y capilares modificados. Durante la estimulación mecánica sexual, el tejido eréctil se llena de sangre proveniente de las arterias. A medida que este tejido se llena, la presión creciente sella las venas que irrigan el pene produciendo su ingurgitación con sangre. La erección resultante (ver figura 1), es esencial para la introducción del pene en la vagina. Algunos mamíferos poseen un báculo, que es un hueso ubicado dentro del pene para ayudar a endurecerlo.

El cuerpo del pene está cubierto por una piel relativamente gruesa. El glande tiene una cubierta mucho más delgada y, en consecuencia, es mucho más sensible a la estimulación. El glande está cubierto por un pliegue cutáneo llamado prepucio (Neil A. Campbell, 2007).

1.1.2 Glándulas accesorias

El aparato reproductor masculino posee tres órganos internos que actúan como glándulas; y son las que confieren el medio acuoso (fluido seminal) al semen, el cual actúa como medio de transporte y fuente de nutrientes para los espermatozoides. Estas glándulas son: Las vesículas seminales, la próstata y las glándulas de Cowper (ver figura 4).

1.1.2.1 Vesículas seminales

Estas glándulas se encuentran en la excavación pélvica, posterior a la vejiga. Son vesículas en forma de tubo lobulado; poseen un epitelio secretor de un líquido viscoso rico en fructosa, fibrinógenos y prostaglandinas, entre otras sustancias. Este par de vesículas aporta con el 60 % del volumen total del semen (Neil A. Campbell, 2007). Dicho líquido es espeso, amarillento y contiene el azúcar fructosa que proporciona la mayor parte de la energía empleada por los espermatozoides. Posee un pH alcalino, el cual permite la neutralización del ambiente ácido de la uretra. Además brinda al semen una enzima coagulante, ácido ascórbico y prostaglandinas que actúan como reguladores locales de la

contracción uterina, lo que ayuda a los espermatozoides a alcanzar el oviducto, en donde se encontrará con el óvulo (Neil A. Campbell, 2007).

El contenido de las vesículas seminales se adiciona a su parte celular en el conducto eyaculador, poco después de que los espermatozoides hayan sido vaciados desde el conducto deferente que entra luego en la glándula prostática.

1.1.2.2 Próstata

La próstata es un órgano glandular, en forma de castaña y es la más grande de las glándulas accesorias. Se localiza en frente del recto, y debajo de la vejiga. Las células secretoras de este órgano producen parte del fluido seminal, el cual es de aspecto lechoso, poco denso y es ligeramente ácido; rico en citrato que se utiliza como nutriente para los espermatozoides; contiene además enzimas anticoagulantes (Neil A. Campbell, 2007). A pesar de la acidez del líquido prostático, el semen (constituido por los espermatozoides y diversas secreciones), es alcalino dado que recibe las secreciones de otras glándulas para que pueda neutralizar el pH normalmente ácido del tracto reproductor femenino (Curtis Helena, 2011).

1.1.2.3 Glándulas de Cowper

En el hombre son un par de glándulas llamadas también glándulas bulbouretrales, que se encuentran debajo de la próstata, dentro del diafragma urogenital junto a la uretra y son del tamaño aproximado a un guisante. Antes de la eyaculación, estas glándulas secretan un líquido claro que le confiere al semen un medio alcalino en su paso a través de la uretra, neutralizando la acidez de este conducto en la eyaculación (Neil A. Campbell, 2007). La secreción de estas glándulas también le confiere al semen una consistencia gelatinosa debido a la mucina presente, que, en el caso del verraco, el ratón y la rata, provoca la formación de un tapón que evita el reflujo del semen hacia el exterior (Neil A. Campbell, 2007).

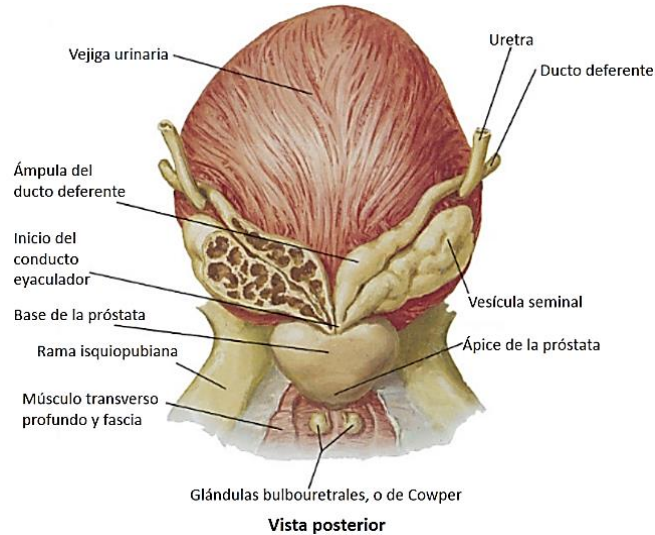


Figura 4. Vista posterior de las glándulas accesorias del hombre.

Fuente: Netter, FH. Atlas of human anatomy. Philadelphia: Saunders Elseiver; 2011. Plate 364.

1.1.3 El espermatozoide

El espermatozoide (del griego sperma: Semilla, y zoo: Animal) es una célula haploide que constituye el gameto masculino (Audesirk Teresa, 2003) y es el producto final de la espermatogénesis (Neill, 2006). Este gameto presenta dos porciones morfológicamente bien diferenciadas: La cabeza y el flagelo. El espermatozoide de rata mide 190 μm de largo (M., 1972).

La cabeza del espermatozoide de mamífero, contiene el núcleo y el acrosoma rodeado por cantidades moderadas de componentes del citoesqueleto y del citoplasma. El acrosoma cubre el extremo anterior del núcleo y los componentes del citoesqueleto se encuentran en el espacio estrecho entre el acrosoma y el núcleo; y entre el acrosoma y la membrana plasmática. Los espermatozoides de la mayoría de las especies de mamíferos tienen una cabeza espatulada; con el acrosoma y el núcleo como estructuras simétricas. Sin embargo, el espermatozoide de algunos roedores como la rata, tiene una cabeza en forma de falciforme (ver figura 6), con el acrosoma sobre el margen convexo del núcleo. El

acrosoma está altamente conservado a lo largo de la evolución y, junto con el axonema, es un sello distintivo de los espermatozoides de los animales en muchos filos. La mayoría de los componentes acrosómicos se producen durante la espermatogénesis, pero algunos comienzan a sintetizarse en espermatocitos del paquiteno tardío (Neill, 2006). La cromatina del núcleo del espermatozoide está altamente condensada y su volumen es considerablemente menor que el volumen nuclear en una célula somática (~ 5 %). La organización, la cantidad de DNA, la disposición y composición de las nucleoproteínas son características únicas del núcleo de espermatozoide. El espermatozoide contiene solo una copia de cada cromosoma parental.

El flagelo es una prolongación de la célula, presente tanto en eucariotas como en procariotas y arqueas. En el espermatozoide, el flagelo consta de cuatro segmentos distintos: La pieza conectora, la pieza media, la pieza principal y la pieza final (ver figura 5). Los principales componentes dentro del flagelo son el axonema, la vaina mitocondrial, las fibras densas externas y la vaina fibrosa. El rasgo característico de la pieza media es la vaina mitocondrial, mientras que la vaina fibrosa define la extensión de la pieza principal. La vaina mitocondrial rodea las fibras densas externas en la pieza media, mientras que la vaina fibrosa rodea las fibras densas externas en la pieza principal. La base del flagelo se apoya en el núcleo en la unión entre la pieza conectora y la cabeza (Neill, 2006). Los flagelos de eucariotas poseen una estructura cilíndrica, uniforme, y con una terminación semiesférica. Su estructura tiene como principal esqueleto al axonema, una vara ondulante de nueve dobletes de microtúbulos que rodean a otros dos centrales. Dos brazos de dineína se encuentran asociados a cada doblete de microtúbulos; así acoplados con la hidrólisis del ATP, generan el movimiento del flagelo. La onda flagelar que se genera, se propaga en un plano perpendicular al par central de microtúbulos del axonema (Neill, 2006).

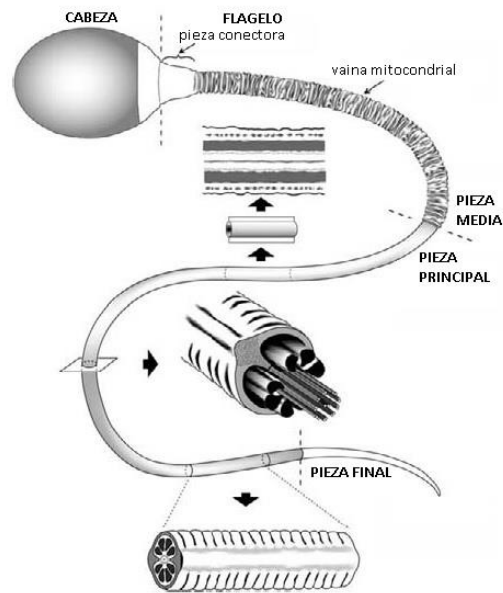


Figura 5. Características generales del espermatozoide de mamífero.

Las regiones del flagelo son la pieza media, la pieza principal y la pieza final. Las vistas en sección longitudinal y transversal de la pieza principal y un segmento de la vaina fibrosa se indican mediante flechas (Neill, 2006).

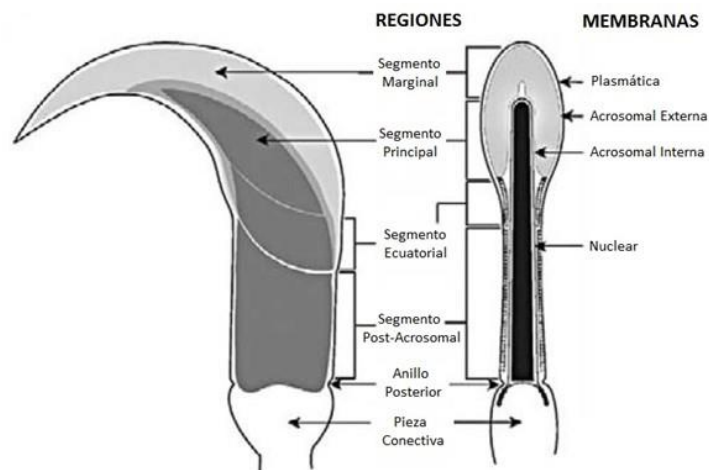


Figura 6. Distribución de regiones y membranas en una cabeza falciforme del espermatozoide (Neill, 2006).

1.1.3.1 Movilidad espermática

El flagelo proporciona la fuerza móvil necesaria para que el espermatozoide alcance la superficie del óvulo y logre la fecundación. Los espermatozoides del caput del epidídimo, en la mayoría de los mamíferos, tienen un ritmo vibratorio lento e inefectivo que a menudo produce patrones circulares de natación. En contraste, los espermatozoides de la cauda del epidídimo, generalmente se mueven con un movimiento vigoroso que resulta en un movimiento rápido hacia adelante, conocido como movilidad activada (Neill, 2006).

Los espermatozoides, dependiendo de su estado de capacitación, presentan dos tipos de movilidad: Movilidad activada y movilidad hiperactivada. La movilidad activada la adquieren durante su maduración en el epidídimo, aunque no se vuelven móviles hasta que se liberan del epidídimo. Este tipo de movilidad se caracteriza por un movimiento flagelar vigoroso y relativamente simétrico, el que resulta en un rápido movimiento progresivo hacia adelante. Después de un período de tiempo en medio capacitante (*in vitro*) o en el tracto reproductivo femenino (*in vivo*), los espermatozoides exhiben una movilidad hiperactivada, caracterizada por un batido flagelar de gran amplitud, ondas flagelares asimétricas y una trayectoria de natación circular o errática (Suarez & Ho, 2003; Yanagimachi, 1981). El movimiento hiperactivado es característico del espermatozoide capacitado (Suarez, 1996; Yanagimachi, 1994).

Los diferentes elementos del flagelo generan y dan forma a las ondas de flexión que producen la fuerza que propaga las ondas desde la base hasta la punta (ver figura 7). El movimiento del espermatozoide se puede evaluar dividiendo su fuerza en dos componentes: Longitudinal y transversal. El componente longitudinal es la fuerza flagelar en dirección longitudinal a la cabeza del espermatozoide; mientras que el componente transversal es la fuerza flagelar en la dirección transversal al eje de la cabeza del espermatozoide (Ishijima, 2011). Un espermatozoide no capacitado tiene un movimiento flagelar uniformemente longitudinal con ciclos de batido de alta frecuencia (Ishijima, 2011). El movimiento flagelar requiere la síntesis continua de ATP (Ishijima, 2016).

En el espermatozoide de mamíferos, la producción de ATP se lleva a cabo por dos vías: (1) la glucólisis, que se produce a lo largo de toda la longitud de la pieza principal del flagelo, y (2) la respiración mitocondrial, centrada en las mitocondrias de la pieza intermedia

(Ramio-Lluch et al., 2011). La respiración mitocondrial es la fuente más eficiente de ATP y de esta manera, se ha inferido que, en condiciones normales; el ATP requerido para la movilidad de los espermatozoides se obtiene principalmente a través de la respiración mitocondrial (Mukai & Okuno, 2004). Se ha observado que los espermatozoides de pacientes astenozoospermicos, con baja o nula movilidad espermática, presentan desordenes mitocondriales tales como: Piezas intermedias más cortas, con menos número de giros en sus mitocondrias, comparado con piezas intermedias de espermatozoides de pacientes normozoospermicos. Sin embargo, el ancho de las piezas intermedias y la longitud de las colas son similares entre espermatozoides de pacientes astenozoospermicos y normozoospermicos (Mundy A. J., 1995). Además, una alta actividad enzimática de los complejos de la cadena transportadora de electrones, se correlaciona positivamente con la calidad de los espermatozoides humanos, particularmente con su movilidad (Ruiz-Pesini et al., 1998; Ruiz-Pesini et al., 2000). Del mismo modo, los niveles de expresión de las subunidades de los complejos de la cadena transportadora de electrones, se asocian con la calidad del espermatozoide (Amaral, Ramalho-Santos, & St John, 2007). Esto último, nos indica también, que defectos o mutaciones a nivel del DNA mitocondrial (mDNA), pueden afectar la movilidad espermática. Los antecedentes descritos han sido respaldados por modelos de ratones transmitocondriales, en los que la acumulación de defectos en mDNA; de genes que codifican proteínas de la cadena transportadora de electrones, fue la causa de su infertilidad (Nakada, Sato, & Hayashi, 2006).

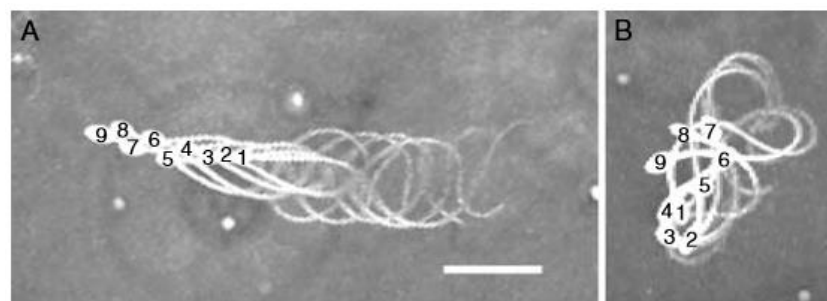


Figura 7. Imágenes comparativas de los movimientos de un espermatozoide de mono activado (A) e hiperactivado (B).

Los números en el centro de las cabezas indican las posiciones sucesivas de estas a intervalos de 20 ms. La barra de escala es de 20 μ m (Ishijima, 2011).

1.1.3.2 Capacitación del espermatozoide

La capacitación es un proceso durante el cual el espermatozoide adquiere la capacidad de fecundar al ovocito (Chang, 1951). Esta capacidad la adquiere después de un tiempo de permanencia en el tracto reproductor de la hembra (Suarez & Ho, 2003; Yanagimachi, 1981).

Los cambios bioquímicos y moleculares que ocurren en el espermatozoide durante la capacitación son: (1) pérdida de colesterol desde la membrana plasmática, (2) redistribución de ciertas proteínas de la membrana plasmática (Rochwerger & Cuasnicu, 1992), (3) regulación de la permeabilidad de la membrana plasmática a iones, (4) fosforilación de varias proteínas (Visconti, Krapf, de la Vega-Beltran, Acevedo, & Darszon, 2011), (5) cambios en el movimiento flagelar denominado “hiperactivación” y (6) exocitosis del contenido acrosomal en respuesta a diferentes estímulos (Shivaji, Kota, & Siva, 2009).

A nivel macromolecular la capacitación se puede dividir de acuerdo a su temporalidad en: Eventos tempranos y eventos tardíos (Visconti, 2009). Los eventos tempranos ocurren unos segundos después de la eyaculación de los espermatozoides, en función de las altas concentraciones de Ca_2^+ y HCO_3^- presentes en el fluido seminal (Visconti, 2009). El HCO_3^- ingresa al espermatozoide a través del cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBC) (Demarco et al., 2003). Este aumento en la concentración de HCO_3^- produce un aumento en el pH intracelular y la activación de un tipo único de adenilil ciclasa presente en el espermatozoide; la adenil ciclasa soluble (SACY). La principal característica de SACY es que se activa con HCO_3^- y Ca_2^+ y no con proteína G o forskolina, como ocurre con la mayoría de las adenilil ciclasas que son proteínas integrales de la membrana. A su vez, HCO_3^- produce un rápido colapso de la asimetría de la membrana plasmática del espermatozoide; atribuible a la activación de enzimas escramblasas, que translocan los fosfolípidos de la membrana, como la fosfatidilserina y la fosfatidiletanolamina (Gadella & Harrison, 2000). Lo anterior aumenta la disponibilidad de colesterol para aceptores externos (Salicioni et al., 2007; Visconti, 2009). Al mismo tiempo, SACY aumenta los niveles intracelulares de cAMP y, posteriormente, la activación de la proteína quinasa A (PKA). La activación de PKA modula la respuesta de los canales de calcio como CatSper, que produce cambios en el potencial de membrana (Wennemuth, Carlson, Harper, & Babcock, 2003) y

aumenta la concentración de Ca^{2+} intracelular (ver figura 8). Estos eventos tempranos, incluyen la activación de movimientos vigorosos y asimétricos de los flagelos; los que ocurren tan pronto como los espermatozoides abandonan el epidídimo.

Los eventos tardíos se inician con la pérdida de colesterol de la membrana plasmática y su consecuente aumento de fluidez. El receptor de colesterol es la proteína albúmina sérica, que puede ser sustituida en la formulación de un medio capacitante por compuestos aceptores de colesterol como las ciclodextrinas (Visconti et al., 1999). El aumento de fluidez de la membrana plasmática permite mantener altos los niveles de HCO_3^- . Durante esta fase, la PKA fosforila varias proteínas en los residuos de Ser y Thr, activando, directa o indirectamente, varias proteínas tirosina quinasas y/o inhibiendo las proteínas tirosina fosfatasas, que finalmente producirán un aumento en la fosforilación de los residuos de Tyr de las proteínas. La fosforilación de proteínas en residuos de tirosina es un marcador de la capacitación y ocurre después de la activación de PKA dependiente de cAMP (Ickowicz, Finkelstein, & Breitbart, 2012). Todos estos cambios conducirán a la capacitación del espermatozoide lo que le permitirá: (1) llevar a cabo la RA inducida por agonistas biológicos tales como la zona pelúcida (ZP) o la progesterona; (2) cambiar el patrón de movimiento flagelar denominado hiperactivación; (3) adquirir un comportamiento quimiotáctico, aunque esto es controvertido en los mamíferos (Salicioni et al., 2007); y (4) fecundar el ovocito (Visconti et al., 1998).

El estudio del proceso de la capacitación, como evento previo a la fecundación, ha permitido desarrollar importantes avances dentro de la biología de la reproducción, en técnicas como la fecundación *in vitro*.

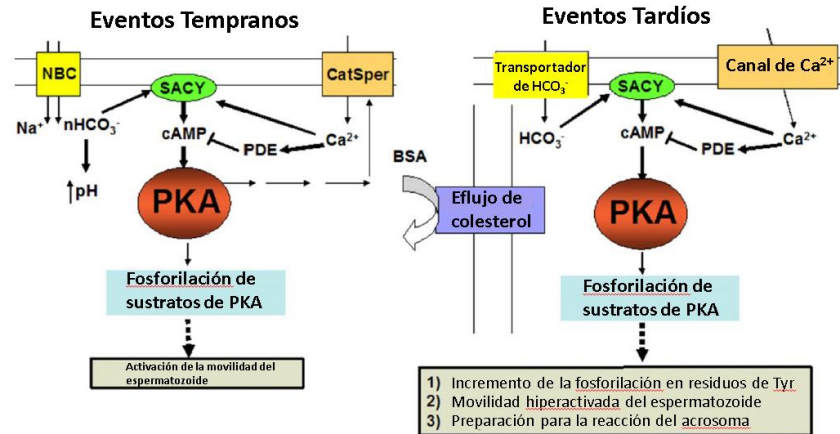


Figura 8. Bases moleculares de los eventos tempranos y tardíos asociados con la capacitación de los espermatozoides.

Adenil ciclasa soluble de espermatozoide (SACY); cotransportador de $\text{Na}^+ / \text{HCO}_3^-$ (NBC); canal de Ca^{2+} específico del espermatozoide (CatSper); fosfodiesterasa (PDE). (Visconti, 2009).

1.1.4 Marcadores de la capacitación

El oviducto o el útero, son los lugares fisiológicos en los cuales ocurre la capacitación en muchas especies (Yanagimachi, 1994). Sin embargo, la capacitación puede realizarse *in vitro* mediante la incubación de los espermatozoides extraídos desde la cola del epidídimo o el eyaculado, bajo una variedad de condiciones en medios definidos que imitan la composición electrolítica del fluido del tracto reproductor femenino. En la mayoría de los casos, estos medios contienen sustratos energéticos, tales como piruvato, lactato y glucosa (dependiendo de la especie), y una fuente de proteínas, normalmente albúmina sérica de bovino (BSA); además de NaHCO_3 y Ca^{+2} (Visconti et al., 1998). Estos últimos componentes se han descrito como inductores de la capacitación, por lo que se puede trabajar *in vitro* con medios que inducen y que no inducen a la capacitación, agregando o no dichos componentes al medio de incubación. Así el medio capacitante (MC), contienen BSA y NaHCO_3 y el medio no capacitante (MNC) no los contiene.

Los espermatozoides capacitados pueden ser detectados evaluando características bien definidas, dentro de las cuales cabe destacar: La hiperactivación del movimiento flagelar (Suarez, 1996), la fosforilación de proteínas a nivel de residuos de tirosina (Visconti et al., 1998), la fosforilación de sustratos de PKA (Gervasi & Visconti, 2016), la pérdida de colesterol a nivel de membrana (Visconti et al., 1999) y la reacción del acrosoma (Visconti et al., 1995); características conocidas como marcadores de la capacitación.

1.1.4.1 Hiperactivación del espermatozoide

La hiperactivación del espermatozoide es una de las principales características que presentan los espermatozoides capacitados (ver figura 9). Este fenómeno consiste en un movimiento asimétrico, con una fuerza transversal más alta que su fuerza longitudinal, y una baja frecuencia de batido del espermatozoide (Ishijima, 2011); el cual se contrasta con el movimiento flagelar simétrico, longitudinal y de alta frecuencia de un espermatozoide activado (ver figura 7). Este movimiento hiperactivado es necesario para la penetración del espermatozoide a través de la zona pelúcida, una densa capa de glicoproteína que rodea al ovocito. Si se evita la hiperactivación, la fecundación no puede ocurrir (Amieux & McKnight, 2002; Boatman & Robbins, 1991; Yanagimachi, 1994).

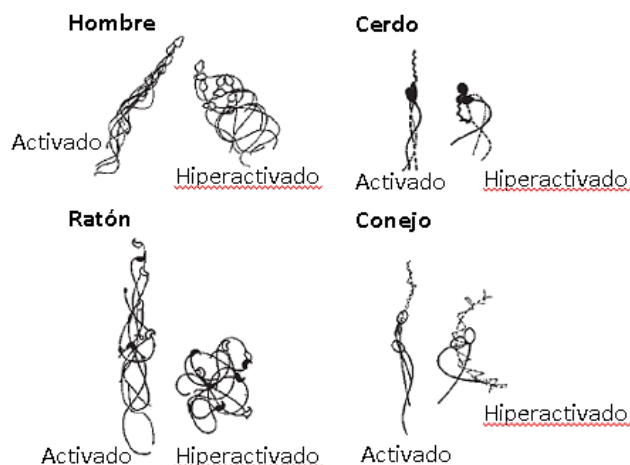


Figura 9. Patrones de movimiento activado e hiperactivado de espermatozoides en diferentes especies.

(Neill, 2006).

Análisis recientes de la hiperactivación del espermatozoide a través de imágenes digitales procesadas, han demostrado que la tasa de deslizamiento entre dobletes de microtúbulos en el movimiento flagelar es constante, sugiriendo que la concentración de ATP en el espermatozoide debe permanecer constante, ya que su concentración se relaciona directamente con la velocidad de deslizamiento de los microtúbulos, por lo que es importante incrementar la producción de ATP cuando se inicia el movimiento hiperactivado. Los resultados de estos análisis también sugieren que, la propulsión generada por un espermatozoide no incrementa durante la hiperactivación (Ishijima, 2011).

1.1.4.2 Fosforilación de proteínas en residuos de tirosina y sustratos de PKA

Como ya habíamos mencionado, dentro de los principales marcadores para la capacitación de los espermatozoides, se encuentra la fosforilación de proteínas en sus residuos de tirosina. Éste proceso depende de la activación de la PKA, en respuesta a un factor inductor de la capacitación; el cual desata una cascada de señalización que confluye en la fosforilación de residuos de tirosina de las proteínas del espermatozoide (Visconti, 2009).

PKA fosforila proteínas en los residuos de serina y treonina dentro del siguiente motivo de aminoácidos: RRXS/T; las que a su vez activan una cascada de señalización que conduce a la fosforilación de residuos de tirosina de las proteínas del flagelo. En la vaina fibrosa se localizan varias proteínas con sitios de anclaje para PKA (AKAP3, AKAP4 y TAKAP-80), lo que sugiere la presencia de PKA activada en la pieza principal del flagelo (Neill, 2006).

Si bien algunos de los aumentos en la fosforilación están involucrados en la regulación de la movilidad hiperactivada, el inicio de la movilidad activada ocurre a los pocos segundos de la exposición al medio que contiene HCO_3^- (Wennemuth et al., 2003). Esto sugiere que los eventos tempranos de la fosforilación en residuos serina / treonina mediados por PKA, están involucrados desde el inicio de la movilidad activada y actualmente se utiliza como marcador de la capacitación.

La marcación de dichos residuos fosforilados, se puede detectar a través de técnicas tales como inmunoensayos, *western blot*, microscopía de fluorescencia, citometría de flujo,

entre otros; utilizando anticuerpos específicos que reconocen los motivos fosforilados en residuos de tirosina y motivos RRXS*/T* (S*/T*, Serina o Treonina fosforilados).

1.1.4.3 Contenido de colesterol en la membrana

El colesterol es un lípido esteroide que se encuentra en los tejidos de los animales y, especialmente, en la membrana plasmática de las células.

Los receptores de lípidos, como la albumina, extraen el colesterol desde la membrana plasmática del espermatozoide; permitiendo el aumento de la fluidez de esta, lo que en consecuencia inicia una reorganización de las proteínas asociadas a la membrana plasmática durante la capacitación del espermatozoide (Topfer-Petersen, Friess, Stoffel, & Schill, 1990; Travis & Kopf, 2002). En este contexto, se demostró que durante la capacitación, ocurre la migración de un análogo de sulfogalactolípidos, incorporado al segmento marginal de espermatozoides de carnero, hacia el segmento ecuatorial (Gadella, Lopescardozo, Vangolde, Colenbrander, & Gadella, 1995). Así mismo, en el espermatozoide capacitado de rata, ocurre la redistribución de una glicoproteína de 37 kDa (Rochwerger & Cuasnicu, 1992).

1.1.4.4 Reacción del acrosoma

El acrosoma es una vesícula secretora, localizada en la zona apical de la cabeza del espermatozoide (ver figura 10). La reacción acrosómica (RA) tiene lugar cuando el espermatozoide entra en contacto directo con la zona pelúcida, logrando la fusión entre la membrana plasmática del espermatozoide y la membrana externa del acrosoma; en distintos puntos a lo largo de la región anterior de la cabeza. Gracias a esta acción, se libera el contenido acrosomal hacia la zona pelúcida, el cual contiene un pool de enzimas hidrolíticas, encargadas de digerir la zona pelúcida. Dentro de dicho pool enzimático se pueden distinguir la acrosina, hialuronidasa, zonadhesina y N-acetilglucosaminidasa, entre otros (Neill, 2006). Así el espermatozoide puede atravesar la matriz extracelular que rodea al ovocito, y, mientras esto ocurre, la membrana acrosomal interna mantiene protegido el contenido de la cabeza del espermatozoide.

La liberación del contenido acrosomal, puede ser de forma regulada o espontánea (Gallon, Marchetti, Jouy, & Marchetti, 2006). Cuando la RA se activa de forma regulada en respuesta a inductores como la progesterona, el espermatozoide se encuentra capacitado. El espermatozoide en su trayecto por el tracto reproductor femenino, se encuentra inmerso en un medio con factores que estimulan la RA, tales como las proteínas presentes en la cubierta ovocitaria, hormonas como la progesterona (proveniente desde el tejido folicular), entre otros (María José del Río, 2007).

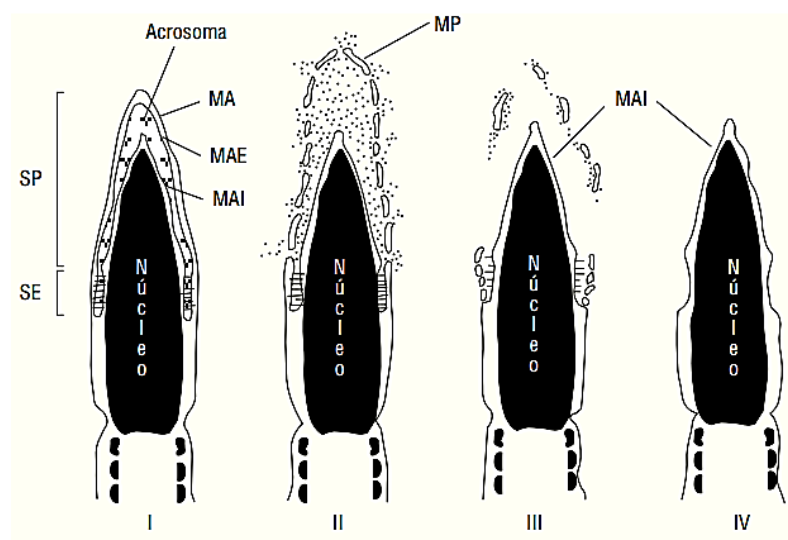


Figura 10. Reacción del acrosoma en el espermatozoide humano.

I. Espermatozoide con el acrosoma intacto (no reaccionado). II. Reacción del segmento principal (SP) del acrosoma: fusión de la membrana acrosomal externa (MAE) y la membrana plasmática (MP) en el segmento principal del acrosoma. III. Reacción acrosómica en el segmento ecuatorial (SE). IV. Espermatozoide con reacción acrosómica del segmento principal y ecuatorial. La membrana acrosomal interna se continúa con la membrana plasmática del segmento post-ecuatorial (María José del Río, 2007).

1.2 ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

1.2.1 La mitocondria en el espermatozoide de mamíferos

Las mitocondrias son organelos de doble membrana, una denominada membrana externa y la otra denominada membrana interna; las cuales están separadas por el espacio intermembrana. La membrana interna, a diferencia de la externa, es altamente selectiva, carece de poros y contiene un alto contenido proteico. Esta envuelve a la matriz mitocondrial, en donde se encuentra contenido el mDNA. En el humano el mDNA es una sola molécula de DNA de doble cadena, de 16569 pares de bases (Anderson et al., 1981). Este posee 37 genes los cuales codifican para 2 rRNAs, 22 tRNAs y 13 polipéptidos que constituyentes de los complejos enzimáticos del sistema de la fosforilación oxidativa (Taanman, 1999). Los polipéptidos codificados por las mitocondrias consisten en siete subunidades de NADH CoQ reductasa (complejo I), citocromo b (complejo III), subunidades I, II y III de la citocromo c oxidasa (complejo IV) y las subunidades 6 y 8 de la H⁺ ATPasa (Anderson et al., 1981). Estos complejos proteicos se localizan en invaginaciones de la membrana mitocondrial interna llamadas crestas mitocondriales. Cada uno de los complejos de la cadena de transporte de electrones, exceptuando el complejo II, tiene subunidades codificadas por el genoma mitocondrial, mientras que el resto están codificadas por el DNA nuclear (Anderson et al., 1981; Cummins, 1998; St John, Sakkas, & Barratt, 2000).

La mitocondria tiene como principal función la generación de energía en forma de poder reductor y ATP. Por lo tanto, como organelo generador de energía, tiene varios propósitos dentro de la función celular, incluyendo la movilidad del flagelo (Ramalho-Santos et al., 2009). Dicha generación de energía se realiza por tres principales vías: El ciclo de Krebs, la cadena transportadora de electrones y la fosforilación oxidativa. El ciclo de Krebs genera el poder reductor en la forma de coenzimas reducidas, la nicotinamida dinucleótido reducida (NADH) y flavín adenín dinucleótido reducido (FADH₂). La cadena transportadora de electrones genera un potencial electro-químico a nivel de la membrana mitocondrial

interna, necesario para la fosforilación del ADP (adenosín difosfato), lo cual genera ATP (ver figura 11). NADH y FADH₂, como productos del ciclo de Krebs, entran en la cadena transportadora de electrones, aportando con dos electrones por medio del complejo enzimático I y el complejo enzimático II respectivamente (David L. Nelson, 2015).

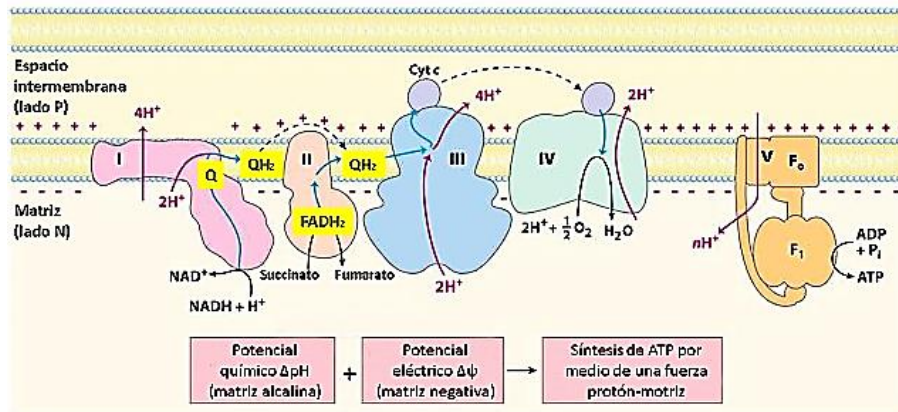


Figura 11. Esquema de la cadena transportadora de electrones en la membrana mitocondrial interna.

Ubiquinona (Q); nicotinamida adenina dinucleótido reducida (NADH) y oxidada (NAD⁺); ubiquinol (QH₂); flavín adenín dinucleótido (FADH₂); citocromo c (Cyt c); adenosín difosfato (ADP); fosfato inorgánico (P_i); adenosín trifosfato (ATP).

Las mitocondrias comprenden aproximadamente el 15–22 % del volumen celular total y proporcionan el 90 % de la energía requerida. Este importante organelo, presente en el citoplasma de todas las células animales y vegetales, rodea la pieza media del espermatozoide de forma helicoidal. Se ha descrito en los mamíferos, que hay aproximadamente de entre 72 a 80 mitocondrias en sus espermatozoides maduros (Folgero, Bertheussen, Lindal, Torbergesen, & Oian, 1993; Spiropoulos, Turnbull, & Chinnery, 2002; St John et al., 2000), ver figura 13. Estos números representarían una disminución de 8 a 10 veces aproximadamente, en el número de copias durante la espermatogénesis (Hecht, Liem, Kleene, Distel, & Ho, 1984).

Las mitocondrias pueden cambiar su morfología, ubicación en la célula y fusionarse a unidades más grandes o separarse (Bereiterhahn & Voth, 1994); dependiendo del tipo de célula y del estado funcional respectivo. Sin embargo, la cadena de eventos de cambios morfológicos en las mitocondrias del espermatozoide, todavía no tiene una explicación funcional detallada. Por otro lado, respecto de su importancia en la fertilidad, se ha propuesto que los defectos genéticos en las mitocondrias pueden comprometer la fisiología del espermatozoide en general, y su movilidad en particular (Anderson et al., 1981; Clayton, 2000). Como contraparte, se ha reportado la existencia de una subpoblación de espermatozoides humanos con alto potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), los cuales además presentan morfología normal, alta movilidad y alto porcentaje de reacción acrosómica inducida por ionóforo de Ca^{+2} (Gallon et al., 2006). Lo que sugiere que podemos utilizar el $\Delta\psi_m$ como un marcador de la calidad del espermatozoide.

En la presente tesis, se pretende establecer una relación entre la función mitocondrial y la capacitación del espermatozoide; utilizando el parámetro de $\Delta\psi_m$, el cual es considerado como un marcador de la actividad mitocondrial (Ramio-Lluch et al., 2011).

1.2.2 Actividad mitocondrial y movilidad del espermatozoide

La actividad mitocondrial define todos los procesos que ocurren en la mitocondria, necesarios para la producción de energía (principal función), entre los que podemos destacar el metabolismo oxidativo de los nutrientes, la cadena transportadora de electrones y síntesis de ATP acoplado a una gradiente electroquímica (David L. Nelson, 2015).

La movilidad del espermatozoide es uno de los parámetros más importantes para definir su capacidad de fecundación; expresando con el movimiento su vitalidad e integridad estructural (Verstegen, Iguer-Ouada, & Onclin, 2002). La infertilidad afecta al 10-15 % de la población, de los cuales aproximadamente el 40 % se debe a etiología masculina, cuya causa es el bajo conteo de espermatozoides (oligozoospermia) y/o la movilidad anormal de los espermatozoides (astenozoospermia) (AnkelSimons & Cummins, 1996; Baker & Aitken, 2005; St John et al., 2000).

El gameto masculino puede sobrevivir gracias a la energía obtenida por glucólisis, sin embargo, para su funcionamiento normal, es en gran parte dependiente del metabolismo oxidativo (AnkelSimons & Cummins, 1996). Varios estudios han confirmado que la movilidad está relacionada con el estado funcional de la mitocondria en humanos (Troiano et al., 1998), equinos (Love et al., 2003), ratas (Gravance, Garner, Miller, & Berger, 2001), jabalíes (Spinaci et al., 2005) y carneros (Martinez-Pastor et al., 2004). Recientemente, se ha establecido una relación positiva entre la movilidad del espermatozoide y $\Delta\psi_m$ (Agnihotri et al., 2016) y el $\Delta\psi_m$ ha sido fuertemente relacionado con el potencial de fecundación de los espermatozoides, medido después de la fecundación *in vitro*, como tasas de fecundación en seres humanos (Kasai et al., 2002; Marchetti et al., 2004; Marchetti, Obert, Deffosez, Formstecher, & Marchetti, 2002). Por lo tanto, podemos evaluar el $\Delta\psi_m$, para establecer una relación entre la actividad mitocondrial (ATP generado por las mitocondrias) y la movilidad/fecundación de los espermatozoides. El $\Delta\psi_m$ también nos permite discernir si un espermatozoide está vivo o no, ya que nos indica si el espermatozoide tiene su metabolismo celular activo.

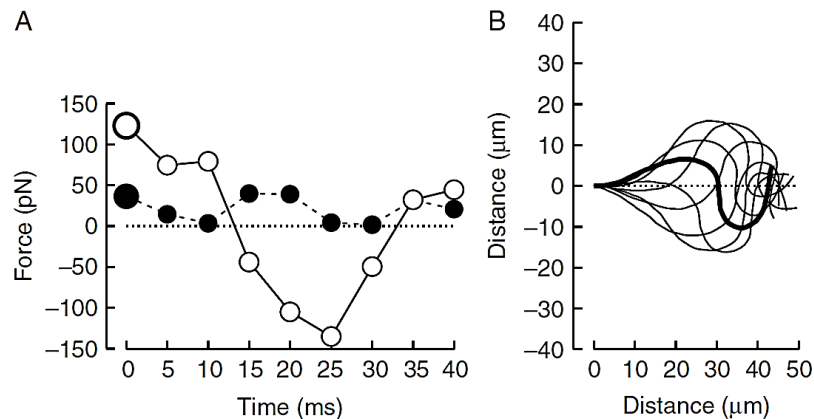


Figura 12. Fuerzas flagelares activadas del espermatozoide de mono.

(A) Gráfico de las fuerzas flagelares, fuerza longitudinal (círculos negros) y fuerza transversal (círculos blancos); y **(B)** gráfico de las ondas flagelares correspondientes al gráfico (A), durante un ciclo completo de batido a intervalos de 5 ms. Los círculos grandes a tiempo cero en (A), corresponden a las curvas gruesas en (B). La fuerza longitudinal propulsora dirigida desde el flagelo a la cabeza se toma como positiva (Ishijima, 2011).

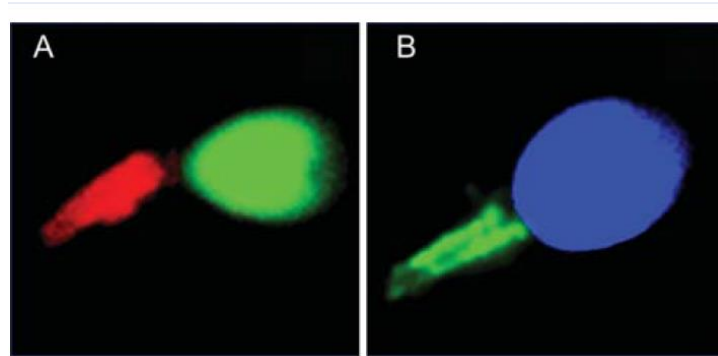


Figura 13. Microfotografía de espermatozoide humano teñidos con marcadores mitocondriales.

(A) La detección del $\Delta\psi_m$ en espermatozoides humanos vivos utilizando Mitotracker Red (rojo); el DNA nuclear se contrasta con SYBR 14 (verde). **(B)** Inmuno-detección de una subunidad de la Citocromo C Oxidasa (COX), parte de la cadena transportadora de electrones (complejo IV), en la pieza intermedia del espermatozoide (verde), el DNA nuclear se contrasta con DAPI (azul). (Ramalho-Santos et al., 2009). Magnificación original100X.

1.2.3 Actividad mitocondrial y capacitación del espermatozoide

Recientemente se ha descrito la existencia de subpoblaciones de espermatozoides de cerdo, con diferente $\Delta\psi_m$; cuya distribución porcentual cambia durante la capacitación (Ramio-Lluch et al., 2011), un hallazgo interesante ya que podemos utilizar este marcador para seleccionar tempranamente una subpoblación y caracterizar su función durante el proceso reproductivo. La existencia de subpoblaciones de espermatozoides no es exclusiva del cerdo, ya que, en humanos se han detectado subpoblaciones de espermatozoides que expresan diferentes receptores en su membrana plasmática. Estos receptores son los receptores de progesterona y fibronectina; cuya distribución porcentual es: Solo receptor de progesterona, 30 %; solo receptor de fibronectina, 40 %; ambos receptores, 10 %; o ninguno de ellos, 20 %. Estos hallazgos implican que, en el eyaculado, existen subpoblaciones de espermatozoides que deben cumplir diferentes funciones durante el proceso reproductivo; siendo el más importante la fecundación del ovocito. Por lo tanto, identificar a aquella subpoblación que contenga al espermatozoide fecundante, implicaría un gran avance para mejorar la eficiencia de los procedimientos de reproducción asistida.

Dado que la actividad mitocondrial nos permite caracterizar subpoblaciones de espermatozoides vivos; proponemos establecer una relación entre el $\Delta\psi_m$ y un marcador de la capacitación. Para ello evaluaremos el $\Delta\psi_m$ durante la capacitación; seleccionaremos y caracterizaremos las distintas subpoblaciones de espermatozoides, utilizando como marcadores de la capacitación la fosforilación en residuos de tirosina, y la fosforilación en sustratos de PKA

Dados los antecedentes citados, nos propusimos la siguiente hipótesis:

HIPÓTESIS

“La subpoblación de espermatozoides que contiene a los espermatozoides con potencial fecundante presenta un alto potencial de membrana mitocondrial”.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la relación existente entre el potencial de membrana mitocondrial y el potencial fecundante del espermatozoide de rata.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el tiempo de incubación necesario para obtener espermatozoides capacitados de rata.
2. Caracterizar la actividad mitocondrial, medida como potencial de membrana mitocondrial, en diferentes tiempos de incubación en medio capacitante y medio no capacitante.
3. Establecer una relación entre la actividad mitocondrial y la capacitación del espermatozoide de rata.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIALES

2.1.1 Materiales de cirugía y microscopía

2.1.1.1 Material quirúrgico

- Tijeras Mayo
- Pinzas romas
- Pinzas dentadas

2.1.1.2 Material para microscopía

- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Esmalte de uñas
- Cámara húmeda
- Aceite de inmersión
- Hemocitómetro
- Contador de células de 8 teclados

2.1.2 Reactivos

2.1.2.1 Sales

- Acrilamida
- Bicarbonato de sodio
- Bis-acrilamida
- Carbonato de sodio
- Cloruro de calcio dihidrato
- Cloruro de potasio

- Cloruro de sodio
- Fosfato de sodio monobásico monohidratado
- Lactato de sodio
- Lactato de sodio
- Piruvato de sodio
- Sulfato de magnesio
- Sulfato ferroso
- Tiosulfato de sodio

2.1.2.2 Tampones

- HEPES
- Fosfato de sodio dibásico
- Fosfato de potasio monobásico
- Tris

2.1.2.3 Detergentes

- Deoxicolato de sodio
- Dodecilsulfato sódico
- Triton X-100
- Tween-20

2.1.2.4 Azúcares

- Agarosa
- D-[+]-Glucosa
- Sacarosa
- Sucrosa

2.1.2.5 Alcoholes

- Etanol
- Glicerol
- Isopropanol
- Metanol

2.1.2.6 Kits

- DC TM *Protein Assay* (Reactivos A, B y S)
- Microcon® Centrifugal Filters
- *Western Lightning plus-ECL*

2.1.2.7 Indicadores de pH

- Rojo de fenol

2.1.2.8 Ácidos

- Ácido clorhídrico
- Ácido láctico
- Ácido pirúvico

2.1.2.9 Anticuerpos

- Anti -fosfotirosina. Clon: 4G10
- Anti -beta-tubulina E7
- Anti-fosfotirosina-PE-ratón
- Anti-IgG de conejo conjugado con Alexa-Fluor⁵⁹⁴
- Anti-ratón IgG, IgM de ratón conjugado con Alexa Fluor⁴⁸⁸
- Anti-sustratos de PKA

2.1.2.10 Otros

- Aceite de inmersión
- Aceite mineral
- Acetona
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)
- Agente reductor TBP
- Albumina sérica de bovino
- Cloroformo
- Ditio-treitol
- Éter

- Fluoromount
- Formalina
- Glicina
- Inhibidores de proteasa en pastillas
- Nigericina
- Para-formaldehído
- Persulfato de amonio
- Tetrametil-etilen-diamina (TEMED)

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Animales

En todos los experimentos, se trabajó con ratas machos de la *Sprague Dawley*, de entre 6 a 8 meses de edad y de 400 a 600 g de peso corporal. Los animales fueron criados y mantenidos en el bioterio de la Universidad de Antofagasta a una temperatura ambiental de 23 °C, con un ritmo circadiano invertido (14 h de oscuridad, y 10 h de luz); esto con el fin de realizar las actividades experimentales en horario diurno. La sala de cirugía se desinfectó con cloro. Luego se limpió con alcohol al 75% v/v junto con los materiales quirúrgicos; todo esto en el transcurso de la mañana. Los machos fueron adormecidos a las 10:00 h, utilizando cloroformo puro en una cámara cerrada; y tan pronto se adormecieron, fueron decapitados para la posterior disección de los epidídimos.

Todos los protocolos de trabajo con animales de laboratorio fueron aprobados por la Comisión de Ética en Investigación Científica de la Universidad de Antofagasta y el Comité Asesor de Bioética de FONDECYT para el proyecto FONDECYT-11121491.

2.2.2 Preparación de medio Biggers Whitten & Whittingham (BWW)

Para empezar a trabajar, los siguientes materiales deben estar autoclavados:

- 1 botella de 500 mL (o 1L en caso de no contar con el volumen anterior).
- 2 botellas de 250 mL.
- 2 filtros (con membrana incluida).
- 3 vasos precipitados de 500 mL con sus respectivos agitadores magnéticos, y enumerados del 1 al 3.
- 1 matraz de aforo 500 mL.
- 2 probetas de 250 mL.

Para 500 mL de medio BWW sin bicarbonato 2X se pesaron los reactivos en las cantidades anotadas en la lista de abajo, y se colocaron en vasos precipitados, rotulados de 1 a 3; de acuerdo al número denotado a la izquierda de cada reactivo:

Stock 2X sin bicarbonato (500 mL).

	Concentración 1X	Peso (500mL).
(1) MgSO ₄ [120,4 g/mol]	1,2 mM	0,15 g
(1) CaCl ₂ *2H ₂ O [147 g/mol]	1,7 mM	0,25 g
(2) KCl [74,55 g/mol]	4,8 mM	0,36 g
(2) NaCl [58,44 g/mol]	94,6 mM	5,53 g
(2) HEPES [260,29 g/mol]	10 mM	2,6 g
(3) Piruvato de Sodio [110 g/mol]	0,25 mM	0,03 g
(3) Glucosa [180,2 g/mol]	5,6 mM	1,01 g
(3) Lactato de Sodio [112,1 g/mol]	21,6 mM	1,86 mL
Rojo Fenol (después del filtrado)	15 µL	

Se disolvieron los componentes de cada vaso precipitado en 100 mL de agua Merck. Luego se vertió el contenido del vaso N° 3 en el N° 2, y después se vertió el vaso N° 1 en la mezcla anterior (3+2). Se adicionó rojo fenol al medio y se ajustó el pH entre 7,2 y 7,4 con HCl 12 N. Finalmente se aforó hasta 500 mL con agua Merck; se tapó con Parafilm y se mezcló por inversión.

Bajo campana y con llama se procedió a filtrar el medio, trasvasándolo a una botella Schott de 500 mL y se guardó a 4 °C como *stock* 2X para posteriormente preparar medio capacitante (MC) y medio no capacitante (MNC).

Para preparar 250 mL de MC y MNC se preparan los siguientes reactivos:

MEDIO NO CAPACITANTE (MNC) 250 mL:

Medio BWW 2X	125 mL
NaCl [58,44 g/mol]	0,37 g
H ₂ O Merck	Hasta 250 mL en probeta.
Filtrar con filtro al vacío.	

MEDIO CAPACITANTE (MC) 250 mL:

Medio BWW 2X	125 mL
NaHCO ₃ [84,01 g/mol]	0,53 g
H ₂ O Merck	Hasta 250 mL en probeta.

Se filtró con el mismo filtro utilizado en el MNC.

Primero se disolvió el NaCl (MNC) o NaHCO₃ (MC) en 100 mL de agua Merck en los matraces; se mezcló hasta obtener una solución homogénea. Luego se trasvasó todo el volumen a una probeta de 250 mL. El matraz se enjuagó con un poco de agua Merck para luego trasvasar todo el contenido a la probeta. A continuación, se adicionaron 125 mL de medio BWW 2X a la probeta, para luego enrasar con agua Merck hasta 250 mL. Se tapó la probeta con parafilm y se mezcló por inversión. Se procedió a filtrar trasvasando a una botella schott de 250 mL (ver figura 14).

Para preparar el MC además se adicionó albúmina sérica de bovino (BSA) en una proporción de 0,15 g de BSA por cada 10 mL de medio.



Figura 14. Soluciones *stock* de medio no capacitante (izquierda), y medio capacitante (derecha).

Se obtienen 250 mL de volumen final. Se puede observar la diferencia que hay en la coloración de dichos medios debido al indicador rojo fenol presente en el medio BWW, principalmente por la presencia de NaHCO₃ en MC.

2.2.3 Obtención de espermatozoides

Después del sacrificio, a cada macho se le extrajo el par de epidídimos, los cuales se mantuvieron en suero fisiológico a 37 °C. Se diseccionó la cauda distal, ya que se ha demostrado en espermatozoides de rata, que cuatro parámetros de movimiento: porcentaje de motilidad, porcentaje de motilidad progresiva, velocidad progresiva y velocidad de trayectoria; son significativamente mayores entre los espermatozoides obtenidos de la cauda distal comparado con la cauda proximal del epidídimo; con una diferencia en magnitud de aproximadamente un 15 % (Slott, Suarez, & Perreault, 1991). Los espermatozoides se liberaron desde la cauda distal del epidídimo en 2 mL de MNC, realizando cortes transversales con la ayuda de una tijera quirúrgica, y se sumergieron al MNC. Este procedimiento duró 5 min y se realizó en placa Petri de 30 mm a 37 °C (los 2 mL pasaron a ser el *stock* de espermatozoides). Terminado el tiempo de liberación, se transvasaron los 2 mL de medio con espermatozoides a un tubo Falcon de 15 mL; con mucho cuidado, ya que en ensayos preliminares se ha observado por simple microscopía de luz, que al manejar bruscamente las muestras (ya sea por pipeteo, vortex o trasvases); los espermatozoides pierden notablemente su movilidad. Se cuantificó el número de espermatozoides en la suspensión *stock*, utilizando una cámara de Neubauer y luego se calculó el volumen necesario de *stock* para lograr una concentración final de 1×10^6 espermatozoides/mL, para 11 mL de MNC o MC (ver figura 15).

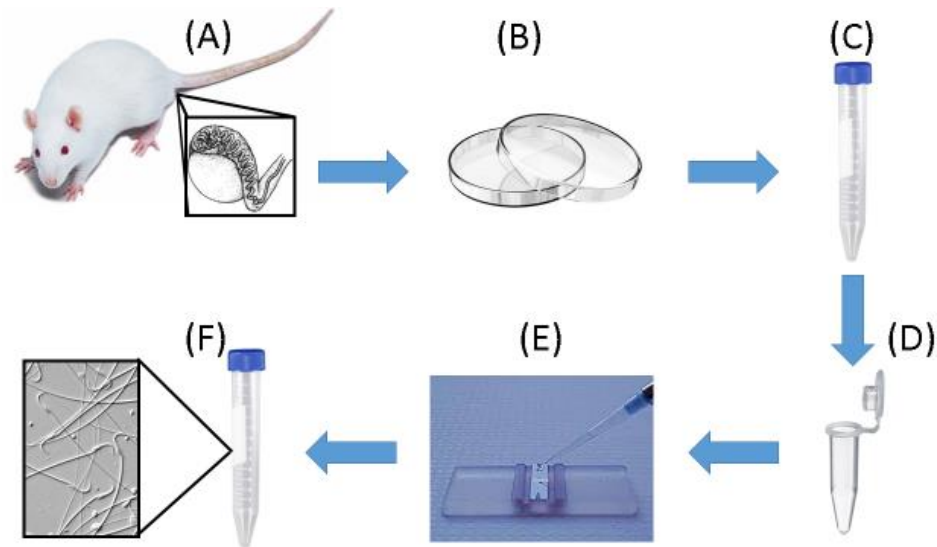


Figura 15. Protocolo para la obtención de espermatozoides, y la posterior cuantificación de células con la ayuda de un hemocitómetro.

(A) Extracción de los epidídimos de la rata. **(B)** Suspensión de espermatozoides de la cauda en MNC sobre placa de Petri. **(C)** *Stock* de espermatozoides (2 mL), en tubo Falcon. **(D)** Dilución 1:100 del *stock* de espermatozoides en agua MilliQ. **(E)** Cuantificación de concentración de espermatozoides por hemocitómetro al microscopio de luz. **(F)** Cálculo del volumen necesario de *stock*, para obtener una concentración de 1×10^6 espermatozoides/mL en cada pocillo con MC o MNC.

2.2.4 Incubación de células para obtener espermatozoides capacitados

Como punto crucial para nuestra investigación, fue indispensable determinar el tiempo de incubación de los espermatozoides en MC para obtener el mayor número de espermatozoides capacitados y vivos; de modo que se pueda establecer uno o varios tiempos de incubación en los que se detecte una diferencia significativa entre los espermatozoides capacitados incubados en MC y MNC. Para lograr esto, se cuantificó el porcentaje de espermatozoides cuyas proteínas presentaron fosforilación en residuos de tirosina, utilizando la técnica analítica de citometría de flujo en célula fijada.

La incubación se realizó en tubos Falcon de 15 mL a 37°C y 5 % de CO_2 . El volumen de incubación fue de 11 mL de MC o MNC. Se inoculó el volumen necesario del *stock* de espermatozoides para obtener una concentración final de 1×10^6 espermatozoides/mL.

Todos los tubos fueron debidamente rotulados con T0, T2, T4, T6 para MNC y MC. Transcurrido el tiempo de incubación respectivo, 10 mL de muestra se procesaron para *western blot* y 1 mL se procesó para citometría.

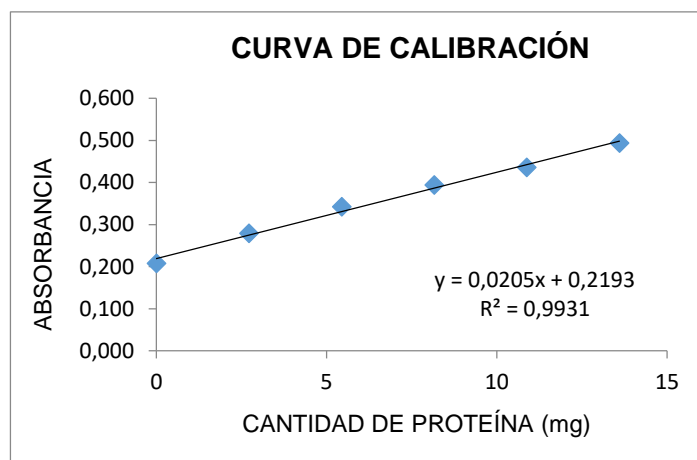
2.2.5 Obtención de proteínas del espermatozoide y cuantificación

El número de espermatozoides que se utilizó fue de 10×10^6 , los cuales fueron lavados 3 veces en 0,5 mL de PBS frío después del tratamiento. Se centrifugó a 14.000 rpm por 5 min y se eliminó el sobrenadante. Se adicionaron 200 μ L de tampón de lisis RIPA (ver apéndice 5.2), se resuspendió el pellet de espermatozoides con la micropipeta y se incubó la suspensión por 1 h en frío. Se sonicó 3 veces, 10 segundos cada vez y se centrifugó a 14.000 rpm por 10 min. Se trasvasó el sobrenadante a otro tubo y se cuantificaron las proteínas por el método de Lowry (*DC Protein assay*). Para la cuantificación se utilizó 20 μ L de la muestra. Con 10×10^6 de espermatozoides por 200 μ L de tampón RIPA, la solución de proteínas queda diluida, por lo que se precipitaron con acetona fría (acetona que se mantiene a -20°C). Para ello, se mezcló un volumen de muestra con 5 volúmenes de acetona (1:5), y se incubó en hielo por 30 min (180 μ L muestra: 900 μ L de acetona). Se centrifugó a 14.000 rpm por 10 min, se descartó el sobrenadante por inversión del tubo y se volvió a centrifugar para eliminar toda la acetona con una pipeta. Se evaporó la acetona remanente manteniendo el tubo con la tapa abierta por 10 min en frío y se adicionó un volumen del tampón de carga (ver apéndice 5.1.3).

La concentración de proteínas de cada muestra de espermatozoides se determinó utilizando el kit *DC Protein assay*. Este kit consta de un ensayo colorimétrico para la cuantificación de proteínas, posterior a la solubilización con detergentes, cuyo método es una versión modificada del ensayo de Lowry (Oliver H. Lowry, 1951), con el fin de acortar el tiempo de trabajo. El kit requiere una incubación de 15 min a temperatura ambiente, siendo una reacción estable durante al menos 2 h. El kit se utiliza con muestras que tienen concentraciones de proteína entre 0,2 y 1,5 mg/mL y requiere sólo 100 μ L de muestra. El procedimiento puede adaptarse fácilmente a un micro ensayo de baja concentración en el cual se utilizó 20 μ L de muestra y se procedió según las instrucciones del fabricante. Se cuantificó la absorbancia a 750 nm. Para determinar la concentración de proteínas de la

muestra se debió preparar una curva estándar, cuyas cantidades se describen en la tabla de la figura 16; y se utilizó tampón RIPA, BSA y agua miliQ. Se graficaron los valores de absorbancia obtenidos para la cantidad de proteína en μg , en cada punto de la curva. Se realizó una regresión lineal con los datos, para obtener la ecuación de la recta $y = mx + b$. $y = \text{Absorbancia}$ y $x = \text{Cantidad de proteínas en } \mu\text{g}$.

Para calcular la cantidad de proteínas en nuestra muestra de $20 \mu\text{L}$, se despejó el valor de x , en la ecuación y se reemplazó el valor de la absorbancia obtenido para cada muestra. Finalmente, se calculó la concentración de proteínas, dividiendo la cantidad de proteína medida por el volumen de muestra usado ($20 \mu\text{L}$).



BSA (μL)	H ₂ O (μL)	RIPA (μL)	BSA ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Proteína (μg)	A
0	10	20	1,36	0	0,208
2	8	20	1,36	2,72	0,279
4	6	20	1,36	5,44	0,342
6	4	20	1,36	8,16	0,394
8	2	20	1,36	10,88	0,436
10	0	20	1,36	13,6	0,494

Figura 16. Curva de calibración para la cuantificación de proteínas totales de espermatozoides.

En la tabla se muestran los valores de absorbancia a 750 nm obtenidos para la curva estándar mediante el ensayo en micro-placa "DC Protein assay".

Volumen muestra (μL)	Muestra	Proteína total	A	Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Cantidad total en 180 μL	Volumen de Tampón 1X (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
20	MC 0 h	14,72	0,521	0,736	132,45	66
20	MC 2 h	7,60	0,375	0,380	68,36	34
20	MC 4 h	9,50	0,414	0,475	85,48	43
20	MC 6 h	9,01	0,404	0,450	81,09	41
20	MNC 0 h	10,42	0,433	0,521	93,82	47
20	MNC 6 h	9,50	0,414	0,475	85,48	43

Tabla 1. Cálculo de la concentración de proteínas totales de obtenidas en un ensayo.

2.2.6 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A las muestras precipitadas con acetona se le agregó el tampón de carga 1X a una concentración de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y se calentó la mezcla por 5 min a 95 °C. La cantidad de tampón de carga que se adiciona se determinó en base a la cantidad de proteína precipitada. Es decir, la cantidad total de proteína contenida en 180 μL de muestra. Usualmente se requirió de sonicación para solubilizar completamente las proteínas.

Se cargaron al gel 40 μg de proteínas (20 μL de muestra) a cada carril y se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12 % (ver apéndice 6.1.4). La electroforesis se realizó en una cámara Mini Protean III (BioRad) a 35 mA, amperaje constante, donde las proteínas se separaron por su peso molecular. Además de cargar las muestras a analizar, se dejó un carril libre para cargar un patrón de peso molecular pre teñido que contiene 8 bandas de proteínas. Así, se pudo monitorear la electroforesis en tiempo real, visualizando las bandas de distinto peso molecular que se localizaron a lo largo del gel. Usualmente la electroforesis se detuvo cuando el frente de corrida marcado por el azul de bromofenol, contenido en el tampón de muestra, alcanzó el extremo inferior del gel.

2.2.7 Western blot

El *western blot* es una técnica analítica para identificar proteínas específicas, en una mezcla compleja de proteínas. Esta técnica utiliza tres etapas para lograr el objetivo: Primero se realiza una separación electroforética unidimensional; luego se realiza la transferencia de proteínas a un soporte sólido, membrana de PVDF o de nitrocelulosa y, finalmente, se visualiza mediante la marcación de proteínas específicas con el uso de anticuerpos primarios y secundarios apropiados.

La proteína separada electroforéticamente y contenida en el gel SDS-PAGE se electro-transfirió a una membrana de PVDF (6 * 9 cm²) a 90 mA, toda la noche a 4 °C. Posteriormente, la membrana de PVDF con las proteínas transferidas se incubó en un tampón de bloqueo (ver apéndice 6.1.6), a temperatura ambiente por 1 h para bloquear las zonas de la membrana de PVDF que no contienen proteína transferida. Para la identificación de proteínas fosforiladas en residuos de tirosina en las muestra de espermatozoides se utilizó el anticuerpo anti-pTyr clon 4G10 (Cat. N°: 555619. BD Biosciences), a una dilución 1:2500 en tampón de incubación I (ver apéndice 6.1.6), durante toda la noche a 4 °C. Luego se lavó 3 veces en tampón de lavado y se procedió a incubar con el anticuerpo secundario biotinilado anti-IgG de ratón a una dilución de 1:5000 en tampón de incubación II (ver apéndice 6.1.6), durante 1 h a temperatura ambiente. Luego se lavó 3 veces en tampón de lavado. Finalmente, se incubó con el conjugado (estreptoavidina-HRP) a una dilución de 1:5000 en tampón de incubación II, durante 1 h a temperatura ambiente y se lavó 3 veces en tampón de lavado. El registro de la marca se realizó por quimioluminiscencia en un cuarto oscuro. Para ello, las membranas fueron incubadas con el sustrato de quimioluminiscencia Western64-Lightning Plus ECL (Cat. N°: NEL104001EA. Perkin Elmer) durante 1 min. Luego se colocó un film, HyperfilmTM ECL (Cat. N°: 28906836. GE Healthcare), sobre la membrana de PVDF en el casete de exposición, Hypercassette (Cat. N°: RPN 11649. Amersham Biosciences) por diferentes periodos de tiempo 1, 3 y 10 min. Luego, los films se sumergieron en la solución de revelado (ver apéndice 6.1.7), agua y la solución de fijación (ver apéndice 6.1.7), hasta que se observaron bandas oscuras en el film; se sumergieron nuevamente en agua y se dejaron secar. Como control de carga se utilizó beta-tubulina (TUBB), detectado con el anticuerpo E7 (Cat. N°: AB 2315513. Hybridoma Bank), a una dilución 1:10.000.

2.2.8 Fijación de espermatozoides

Para poder evaluar las condiciones fisiológicas de los espermatozoides en el tiempo del análisis fue necesario fijarlos; esto quiere decir que las células, por medio de la incubación con paraformaldehído (kit *cytofix/cytoperm*[™]), mantienen las mismas características que tenían en el punto de evaluación. Esto nos permitió poder determinar la condición fisiológica del espermatozoide en cada punto de incubación, eliminando las posibilidades de que las células cambien sus propiedades biológicas en el tiempo transcurrido desde el punto de incubación hasta su análisis por citometría (ver figura 17). Para la fijación se utilizó 1 mL de espermatozoides obtenidos en el protocolo de incubación.

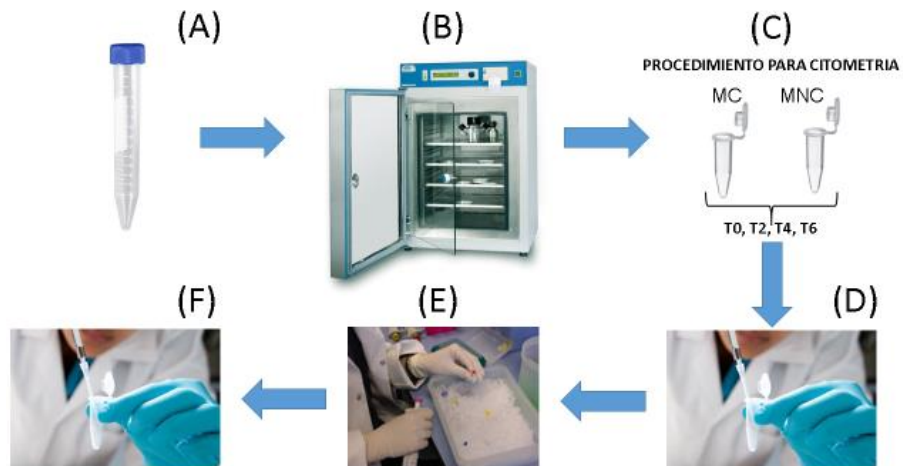


Figura 17. Protocolo de fijación de espermatozoides utilizando el kit Cytofix/Cytoperm[™]. (A) Inoculación del stock en tubos falcon. Concentración final de 1×10^6 espermatozoides/mL. (B) Incubación de los espermatozoides a 37 °C y 5 % de CO₂. (C) Centrifugación en tubos eppendorf para obtención de pellet de espermatozoides. (D) Re suspensión de espermatozoides en PBS 1X a 37 °C y posterior centrifugado. (E) Incubación de espermatozoides re suspendidos en solución de fijación/permeabilización a 4 °C por 20 min. (F) Centrifugado y re suspensión de espermatozoides en tampón de lavado.

Una vez que los espermatozoides fueron incubados hasta la hora designada (T0; T2; T4 y T6), se procedió a seguir el protocolo de fijación del kit *cytofix/cytoperm*[™] (ver figura 18). Para ello, se centrifugaron los tubos de muestra a 10.000 rpm por 1 min. Se descartó

el sobrenadante y se adicionó 1 mL de PBS 1X ambientado a 37 °C. Luego se re suspendió suavemente por pipeteo para centrifugar a 10.000 rpm por 1 min; se descartó el sobrenadante y se re suspendió el pellet de espermatozoides suavemente en 200 µL de solución de fijación/permeabilización, y se incubó por 20 min a 4 °C (en hielo). Después se centrifugó a 10.000 rpm por 1 min, se descartó el sobrenadante y se lavó re suspendiendo en 500 µL de tampón de lavado 1X, se centrifugó a 10.000 rpm por 1 min y se descartó el sobrenadante. Finalmente las células se dejaron re suspendidas en 500 µL de tampón de lavado 1X y se almacenaron a 4 °C, para su posterior incubación con anticuerpos y evaluación por citometría.



Figura 18. Kit cytofix/cytoperm™ de BD Biosciences.

Dos botellas: Una de solución de fijación y otra de permeabilización. Luego de este tratamiento, se aplicaron los lavados posteriores utilizando el tampón de lavado del mismo kit.

2.2.9 Citometría en célula fijada

Luego de la fijación, fue necesario detectar las células pTyr+ (capacitadas) de las células pTyr- (no capacitadas). Como mencionamos anteriormente, la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina ha sido utilizada como marcador de espermatozoides capacitados. Fue por esto que se utilizó un anticuerpo que reconoce los residuos tirosina

fosforilados en las proteínas conjugado con una molécula fluorescente (pTyr-PE, Cat. 558008, BD Bioscience), para así determinar el porcentaje de espermatozoides capacitados. El anticuerpo usado está acoplado a la molécula fluorescente ficoeritrina (PE).

Luego de haber fijado los espermatozoides, se procedió con el protocolo para la citometría. Para comenzar se rotularon tubos de 0,6 mL nuevos y envueltos en papel de aluminio, según los puntos a trabajar (MNC y MC en T0, T2, T4, T6, y MC control). Los tubos con las células fijadas en el paso anterior (volumen final de 500 μ L) se centrifugaron a 10.000 rpm por 5 min para luego descartar el sobrenadante y adicionar 500 μ L de PBS-BSA 2 %*. El pellet se re suspendió suavemente por inversión 5 veces con p1000. El re suspendido se centrifugó a 10.000 rpm por 5 min, se descartó el sobrenadante y se re suspendió (suavemente) 5 veces por inversión, en 170 μ L de PBS-BSA 2 %. Luego se trasvasaron 80 μ L de cada muestra a sus respectivos tubos rotulados y se adicionó el anticuerpo pTyr-PE y PBS+BSA 2 %, como se indica en la tabla 2.

	CONTROL (T0MC)	MC (T0, T2, T4 y T6)	MNC (T0, T2, T4 y T6)
pTyr-PE (μ L)	-	5**	5**
PBS + BSA 2 %* (μ L)	20	15	15
Muestra (μ L)	80	80	80

Tabla 2. Volúmenes de reactivos usados para la detección de espermatozoides pTyr+ por citometría de flujo.

Se procedió a incubar por 2 h en un rotor (ver figura 19), a temperatura ambiente y siempre en oscuridad. Cumplido el tiempo de incubación, se agregaron 200 μ L de PBS-BSA 2 % y se re suspendió con pipeta de 200 μ L (p200). Finalmente se trasvasó todo el volumen a tubos para citómetro correctamente rotulados y se procedió a leer en el citómetro. Para ello se utilizó un láser de 488 nm de longitud de onda para excitar la molécula fluorescente; y se detectó la señal emitida con el detector 585/29 del citómetro.

En la parte electrónica del citómetro, las señales lumínicas se traducen a señales eléctricas; estas últimas en definitiva, son procesadas por un ordenador que organiza los datos en gráficos y/o tablas estadísticas para su posterior análisis.

*Se diluyeron 0,2 g de BSA en 10 mL de PBS.

**De acuerdo a la información del proveedor del anticuerpo pTyr-PE, se recomienda trabajar a una concentración de 20 μL de anticuerpo por cada 100 μL de muestra. Sin embargo, nosotros estandarizamos el protocolo y determinamos que con 5 μL de anticuerpo obtenemos la marcación adecuada.



Figura 19. Rotor utilizado para la incubación de las muestras tratadas con el anticuerpo primario y secundario.

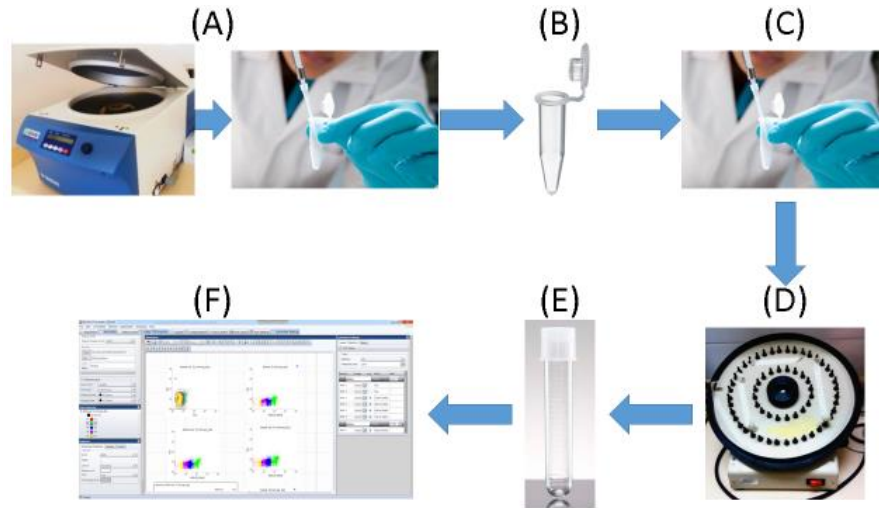


Figura 20. Protocolo para la detección de residuos de tirosina fosforilada en las proteínas del espermatozoide, por citometría de flujo.

(A) Centrifugación y lavado de muestras. **(B)** Re-suspensión de pellet en PBS-BSA 2 %. **(C)** Adición de anticuerpo pTyr-PE. **(D)** Incubación en rotor a oscuridad toda la noche. **(E)** Transvaso de muestras a tubos para citometría. **(F)** Lectura por citómetro. Obtención de datos estadísticos.

2.2.10 Citometría en célula viva.

Para poder establecer una relación entre la capacitación de los espermatozoides y su actividad mitocondrial, fue necesario analizar las variaciones que ocurren a nivel del $\Delta\psi_m$, a diferentes tiempos de incubación en MC y MNC. En el diseño experimental de este objetivo, nosotros elegimos, de acuerdo a los resultados obtenidos en el primer objetivo, el mismo intervalo temporal, pero con un desfase de 30 min (0,5 h), debido a la pre incubación con *MitoStatus Red*TM (N° Cat: 564697. BD *Pharmigen*), el cual es un marcador fluorescente del $\Delta\psi_m$. La emisión de fluorescencia de *MitoStatus Red* (MTred), puede ser detectada por citometría de flujo.

Para este análisis, fue indispensable que las células estuvieran vivas, de modo que se pudiera monitorear la dinámica del número de espermatozoides que presenten una mayor o menor señal; y por esto mismo, no fue necesario fijar a los espermatozoides.

En células sometidas a apoptosis, estrés oxidativo, necrosis y otros procesos celulares, el $\Delta\psi_m$ puede despolarizarse. Por ejemplo, en las células sometidas a apoptosis,

las proteínas de la familia pro-apoptótica Bcl-2 causan la permeabilización mitocondrial de la membrana externa (MOMP), lo que resulta en la liberación del citocromo C y la posterior activación de la caspasa-9 y la cascada apoptótica (Gottlieb, Vander Heiden, & Thompson, 2000). El MOMP a menudo se correlaciona con la pérdida del $\Delta\psi_m$, que puede detectarse utilizando tinciones sensibles al $\Delta\psi_m$. Estas moléculas, de naturaleza catiónica y lipofílica, se acumulan dentro de las mitocondrias de las células sanas, pero no dentro de las mitocondrias que han perdido su $\Delta\psi_m$ debido a la inducción de apoptosis, o al tratamiento con un desacoplador mitocondrial. MTred, es una molécula fluorescente que es fácilmente secuestrado por las mitocondrias activas, lo que permite el análisis de imágenes por citometría de flujo para evaluar la apoptosis o la despolarización mitocondrial. Las células apoptóticas, o con mitocondrias despolarizadas, tendrán niveles de fluorescencia disminuidos. MTred tiene un máximo de excitación de 622 nm y un máximo de emisión de 648 nm.

En este protocolo se incubó a los espermatozoides en una placa de 24 pocillos que contenían 1 mL de MNC o MC. Una vez calculado el volumen necesario del *stock* de espermatozoides para obtener una concentración de 1×10^6 células/mL, se inoculó en todos los pocillos correctamente rotulados con el tiempo que haya correspondido (T0,5; T2,5; T4,5; y T6,5), ver figura 21. Se incubó a 37 °C, en una atmósfera de 5 % de CO₂. Luego se diluyeron 5 μ L de 0,8 mM de MTred, en 500 μ L de MNC (nuevo *stock* de concentración final: 8 μ M), y luego se adicionó a cada pocillo 6 μ L del MTred (nuevo *stock*), por cada 1 mL de medio (concentración final: 48 nM); de acuerdo al tiempo de incubación en MC o MNC. Se incubó por 30 min a 37 °C, en una atmósfera de 5 % de CO₂. Finalmente las muestras incubadas se trasvasaron a tubos para citometría correctamente rotulados y se procedió a leer en el citómetro (Láser: 640 nm; detector: 660/20).

Para verificar si los espermatozoides eran viables o no, se utilizó nigericina. Este reactivo es un poliéter ionóforo que cataliza el intercambio electro neutro de metal alcalino K⁺ por H⁺, de modo antipuerto, esto quiere decir que transporta dos especies químicas hacia direcciones opuestas (Guffanti, Davidson, Mann, & Krulwich, 1979). Interrumpe el potencial de membrana y estimula la actividad ATPasa en la mitocondria (Eytan, Carlenor, & Rydstrom, 1990). La nigericina transporta cationes monovalentes a través de membranas con la siguiente especificidad: K⁺ > Rb⁺ > Cs⁺ >> Na⁺. La nigericina mata las bacterias al

facilitar la difusión de iones a través de las membranas (Guffanti et al., 1979). Es ampliamente utilizado en estudios de las consecuencias que tienen los cambios en el potencial de membrana en varios sistemas (Ganzle & Vogel, 2003).

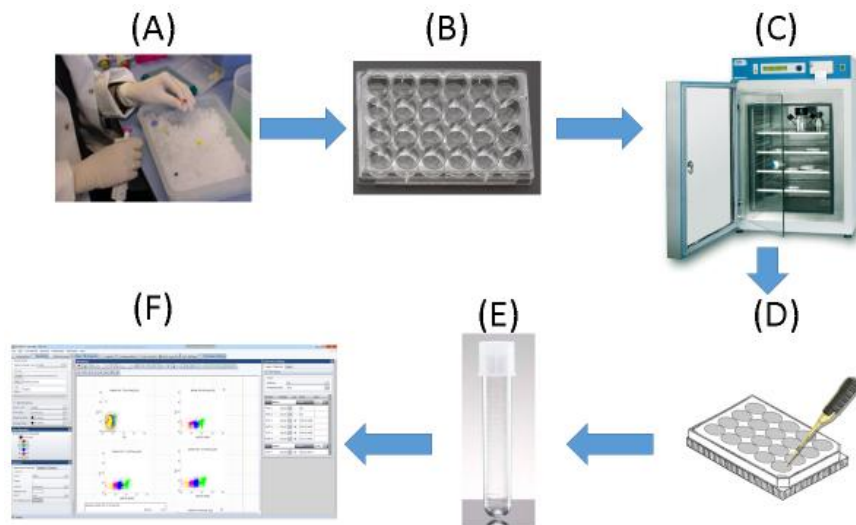


Figura 21. Protocolo para determinación de la actividad mitocondrial, por citometría de flujo en célula viva.

(A) MTred diluido en MNC (*stock* concentración molar $8 \mu\text{M}$). **(B)** Adición de MTred a muestras de espermatozoides en cada pocillo. **(C)** Incubación de espermatozoides con MTred. **(D)** Transvase de muestras a **(E)** tubos para citometría. **(F)** Lectura de muestras por citómetro, obtención de datos estadísticos.

2.2.11 Clasificación de células (*sorting*)

La opción de *sorting* que posee el citómetro de flujo BD FACSJazz™, permite realizar un muestreo selectivo de todas aquellas células que presenten características similares; en este caso, intensidades de fluorescencia semejantes. Dicha modalidad es muy útil cuando el objetivo del investigador es el de analizar las características de un tipo particular de células (en este caso, subpoblaciones de espermatozoides).

La clasificación de los espermatozoides se inició después de identificar la población de células a seleccionar. Una corriente de fluido que contenía la muestra de células, fue canalizada a alta presión por el sistema de fluidos. Una vez que la muestra pasó por el punto de interrogación (ver figura 22), el fluido se transformó en microgotas. Si una célula coincide con los parámetros especificados (con la ayuda del software FACS de BD), el citómetro le aplica una carga eléctrica positiva o negativa a la microgota en la que se encuentra inmersa la célula seleccionada. Esto hace que la gota cargada sea atraída hacia uno de los electrodos de atracción magnética positiva o negativa, lo cual permite la recolección de la muestra seleccionada, a un tubo recolector. La velocidad de adquisición depende del número de células suspendidas por volumen final del medio. Es así entonces, como se pueden clasificar las subpoblaciones de espermatozoides con diferente actividad mitocondrial y realizar posteriores análisis con el fin de caracterizar las subpoblaciones. Las microgotas que no están cargadas, continúan en la corriente a un contenedor de desechos. El sistema del modelo BD FACSJazz™ puede clasificar hasta dos subpoblaciones al mismo tiempo.

Con el objetivo de establecer una relación entre la actividad mitocondrial y la capacitación (punto crucial para nuestra investigación); se propuso caracterizar las cuatro subpoblaciones de espermatozoides que presentaron diferente actividad mitocondrial (según el protocolo del kit MTred, ver página 63), las que arbitrariamente se clasificaron en: Súper baja (A1), baja (A2), alta (A3) y súper alta actividad mitocondrial (A4); dentro del mismo tiempo de evaluación (tiempo 4,5 h). Las muestras del tiempo 4,5 h se marcaron con MTred, ya que en dicho tiempo, se obtuvo un 30 % de espermatozoides capacitados y un menor porcentaje de espermatozoides inmóviles, comparado con el tiempo 6,5 h. Estas muestras se procesaron en el citómetro de flujo por medio de una opción para clasificación de células, llamada: *Sorting*. Así, para el *sorting*, se debieron extraer desde dos muestras dos pocillos de 1 mL de MC; incubadas hasta el tiempo 4,5 h y tratadas previamente según el protocolo para MTred; para trasvasarlas a tubos de citometría y proceder con la clasificación de células (ver figura 20).

Con el *sorting* se pudo realizar la división de la muestra en 4 subpoblaciones de espermatozoides (ver figura 22). Así, una vez purificadas las poblaciones con diferentes intensidades de actividad mitocondrial; fue necesario concentrarlas (método detallado en la

siguiente sección). Esto último fue debido a que por cada *sorting* realizado, las muestras fueron diluyéndose, ya que para este proceso se mezclaron con un tampón especial. Este tampón (Facs-Fluo de BD Science), es una solución que ayuda a mantener intactas las propiedades de la muestra mientras pasa por el punto de interrogación (lugar en donde se intersecta el láser con las gotas de la muestra).

Fue así como subsecuentemente las subpoblaciones se pudieron caracterizar por inmunofluorescencia; para marcar las células que se encontraban capacitadas. La inmunofluorescencia de los espermatozoides seleccionados se realizó con anticuerpo PE-Mouse antifosfotirosina (Cat. N°: 558008. BD *Phosflow*TM) y el anticuerpo anti-sustratos fosforilados de PKA (Cat. N°: 9624. *Cell Signaling Technology*[®]).

SELECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES CON DIFERENTES $\Delta\psi_m$

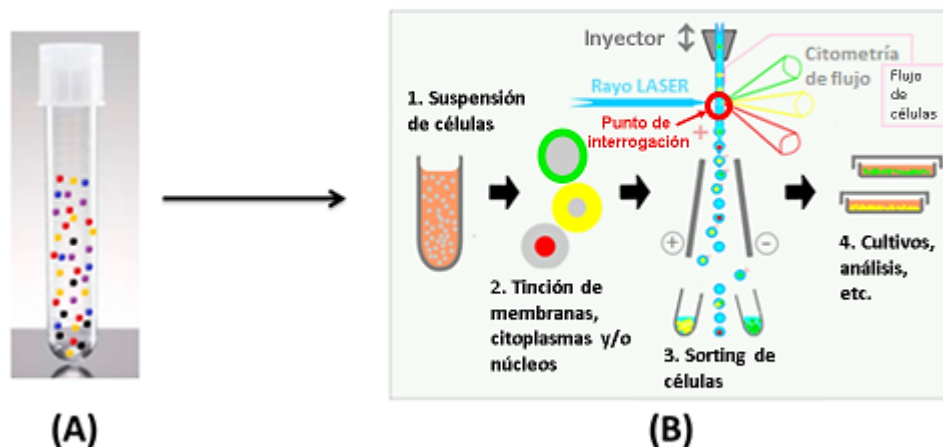


Figura 22. Protocolo para la selección de subpoblaciones de espermatozoides con diferente $\Delta\psi_m$.

(A) Alícuotas de dos pocillos (2 mL) a las 4 h de incubación en MC. (B) espermatozoides marcados con MTred en tubo para citometría. Los puntos representan a los espermatozoides; y sus colores (designados arbitrariamente), a las diferentes intensidades de fluorescencia de las poblaciones. Aquí se puede ver cómo desde una suspensión de células de diferentes intensidades de fluorescencia, son seleccionadas por cargas aplicadas por el mismo equipo a cada una de las gotas generadas por el sistema de fluido. Una vez separadas las muestras por su carga, son depositadas a sus respectivos tubos (imagen tomada de la página web: http://www.flowlab-childrens-harvard.com/new_user/).

Fue así como con la ayuda del citómetro de flujo, se pudo agrupar a los espermatozoides en cuatro subpoblaciones de células, que comparten niveles similares de $\Delta\psi_m$.

2.2.12 Inmunofluorescencia indirecta

Una vez clasificada la población de espermatozoides que se necesitaba determinar el porcentaje de células pTyr y sustratos de PKA positivas y se procedió con el protocolo de inmunofluorescencia.

Se debía obtener un volumen de a lo menos 500 μL de muestra “*post sorting*” en tubos Falcon de 15 mL, para luego trasvasarlas a tubos *Microcon® Centrifugal Filters* de Millipore; los cuales son especiales para concentrar suspensiones de células. Estos tubos se dividen en dos partes: (1) un tubo recolector que es la parte más grande y (2) un tubo filtro, el cual se encaja dentro del tubo recolector (ver figura 23).

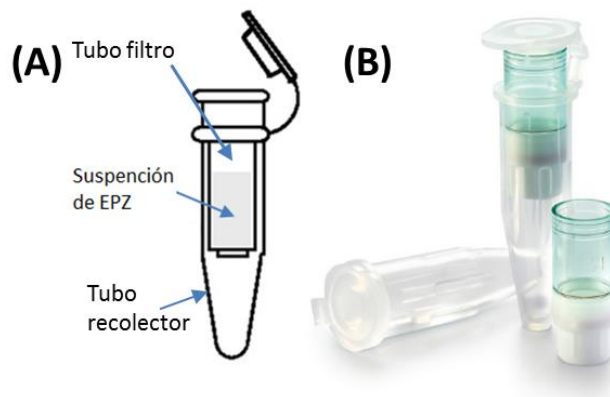


Figura 23. Tubos para concentrar los espermatozoides después del *sorting*.

(A) Dibujo de un tubo filtro *Microcon® Centrifugal Filters*, Millipore. El tubo filtro se encaja dentro del tubo recolector. La muestra (suspensión de células), se trasvasa al tubo filtro, para luego aplicar centrifugación hasta que todo el líquido del buffer escurra al fondo del tubo recolector, quedando así una capa de células (en este caso de espermatozoides), adherida a la membrana del tubo filtro. **(B)** Imagen de izquierda a derecha: Tubo recolector (acostado), tubo recolector más “tubo filtro” (ensamblado), y “tubo filtro” solo (vertical). Imagen tomada desde la página oficial de *Millipore™*.

Se rotularon los tubos microcon, de acuerdo a la población que se quiso trabajar (A1, A2, A3 y A4). Los tubos se centrifugaron a 14.000 rpm por 60 min a 4 °C, y se descartó el líquido escurrido en el fondo del tubo. En los casos que aún había líquido en el filtro, se centrifugó 10 min más.

Se adicionaron 200 µL de agua MilliQ al tubo microcon para lavar y se centrifugó a 14.000 rpm por 30 min. Después se descartó el agua escurrida en el fondo del tubo, y se centrifugó para desechar lo que haya sobrado, con micropipeta p200. Los espermatozoides contenidos en el tubo de filtrado se re suspendieron en 40 µL de agua MilliQ, y se invirtieron hacia un tubo nuevo. Se centrifugó hasta que toda la muestra quedó en el fondo del tubo nuevo, para luego extender 20 µL de suspensión de espermatozoides en cada pocillo de una impronta (ver figura 24). Se verificó si la cantidad de espermatozoides era adecuada para su conteo, observando una gota al microscopio; en caso contrario se procedió a diluir la muestra. Se dejó secar toda la noche a temperatura ambiente dentro de una placa Petri. Una vez adheridos los espermatozoides a la impronta se volvieron a permeabilizar con acetona a -20 °C por 5 min. La muestra se lavó con agua MilliQ 3 veces. El sobrenadante se dejó secar y se guardó en cámara húmeda. Luego, las muestras se bloquearon con tampón PBS-Tritón 0,2 %-BSA 2 % por 30 min, para incubarlas a temperatura ambiente con el anticuerpo primario anti-Fosfotirosina clon 4G10 (Cat.: 05-321. *Millipore*™), a una dilución de 1:200** (20 µL por pocillo de impronta) toda la noche.

Al día siguiente se procedió a lavar con PBS-Tritón 0,2 % tres veces por 5 min en agitación constante. Luego se incubó con el anticuerpo secundario Anti-ratón IgG, IgM conjugado con Alexa Fluor⁴⁸⁸ (Cat. N°: A10684. *Life technologies*™) con una dilución de 1:200** por 1 h a temperatura ambiente (siempre en oscuridad). La impronta se lavó con PBS-Tritón 0,2 %, 3 veces por 5 min en agitación constante, en oscuridad igualmente. Se lavó con agua MilliQ tres veces sin agitación y se dejó secar. Finalmente la impronta se montó con *Fluoromont-G* (Cat. N°: 17984-25. *Electron microscopy Sciences*) y se colocó un cubre-objeto para su observación al microscopio (ver figura 25).

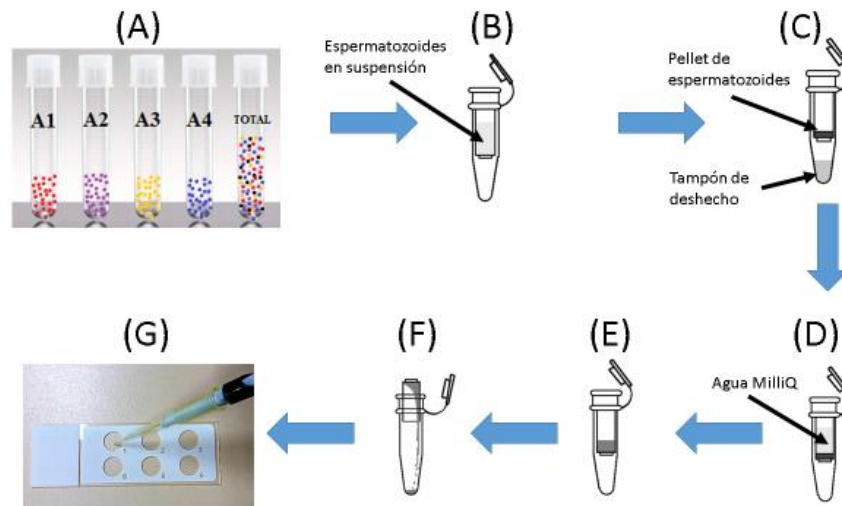


Figura 24. Protocolo para la concentración y extendido de espermatozoides *post-sorting*. (A) Subpoblaciones de espermatozoides "*post-sorting*". El tubo "TOTAL" contiene a los espermatozoides del tiempo 4,5 h original (sin *sorting*), diluidos en tampón FACS Flow. (B) Transvase de las muestras a los tubos Microcon y centrifugación. (C) Descarte del tampón escurrido en el tubo recolector. (D) Re suspensión de pellet de espermatozoides en agua MilliQ y centrifugación. Se descarta el líquido escurrido. (E) Re suspensión de los espermatozoides en agua MilliQ. (F) inversión del tubo filtro en un tubo recolector nuevo y centrifugación. (G) Extensión y secado de muestras en impronta.

*Se calculó cuánto volumen en total de PBS-Tritón 0,2 %-BSA 2 % se necesitó para cubrir todos los pocillos para bloquear. Además, se le debió sumar el volumen necesario para las diluciones de los anticuerpos y el volumen total necesario para cubrir todos los pocillos.

**Se diluyó 1 μL de anticuerpo primario en 200 μL de PBS-Tritón 0,2 %-BSA 2 % (dilución 1:200). Lo mismo para el anticuerpo secundario, anti-IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor⁴⁸⁸.

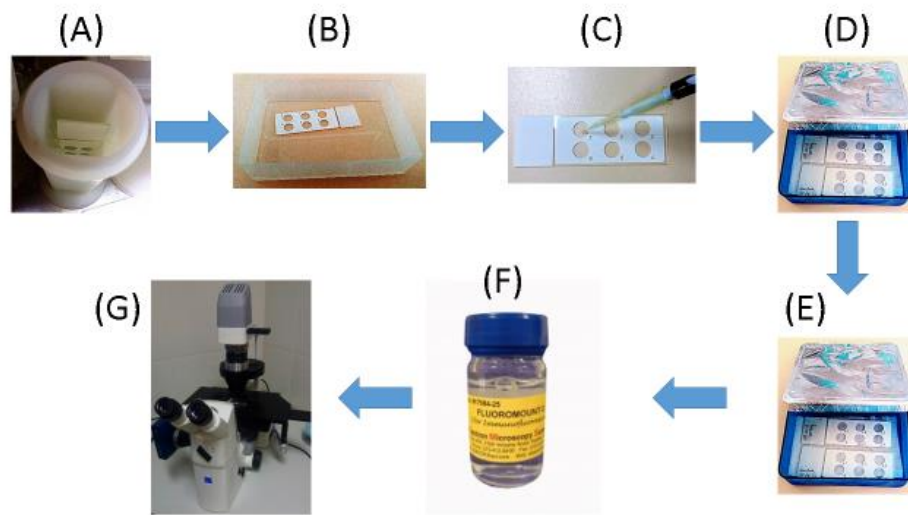


Figura 25. Protocolo para la inmunofluorescencia de los espermatozoides seleccionados *post-sorting*.

(A) Fijación y permeabilización de los espermatozoides. **(B)** Lavado con agua MilliQ. **(C)** Bloqueo con PBS-Tritón 0,2 %-BSA 2 % y lavado con agua MilliQ. **(D)** Incubación con anticuerpo anti-pTyr (clon 4G10; dilución 1:200). **(E)** Lavado con PBS-Tritón 0,2 %-BSA 2 % e incubación con anticuerpo conjugado con a Alexa Fluor⁴⁸⁸. **(F)** Montaje de las improntas con Fluoromont. **(G)** Conteo de los espermatozoides totales y marcados, en microscopio de fluorescencia. Cálculo de porcentajes.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 RESULTADOS

3.1.1 Objetivo 1: Determinar el tiempo de incubación necesario para obtener espermatozoides capacitados

Como punto de inicio, y para poder realizar la presente investigación, fue imprescindible identificar el tiempo de incubación en MC, donde los espermatozoides inician su proceso de capacitación *in vitro*, hasta un punto en el que haya un número significativo de espermatozoides que presenten características propias de los que están capacitados. La parte experimental diseñada para este objetivo permitió observar un patrón de marca repetitivo en cada ensayo.

Según el diseño experimental, se hizo una comparación (para cada tiempo), entre MC y MNC; comenzando desde el tiempo 0 h hasta las 6 h de incubación, para la determinación de los niveles y el número de espermatozoides marcados con pTyr por *western blot* y citometría de flujo.

3.1.1.1 Western blot

Los espermatozoides fueron procesados como se indica en la sección de materiales y métodos. Para el análisis por *western blot*, se observó un incremento progresivo de la intensidad de varias bandas de proteínas pTyr desde las 2 h, hasta las 6 h de incubación en MC. Este incremento progresivo, no se observó en espermatozoides incubados en MNC (ver figura 26). Para este experimento se realizó con un N = 1, las réplicas experimentales las realizamos por citometría.

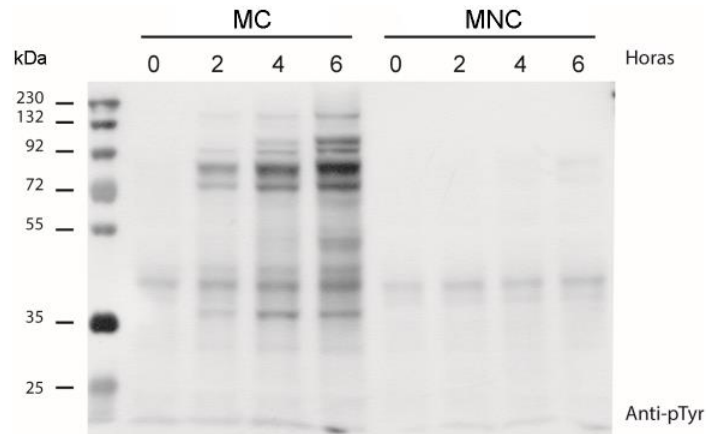


Figura 26. Fosforilación en residuos tirosina de espermatozoides incubados en MNC y MC. Se puede apreciar un incremento progresivo en la marca, desde las 2 h de incubación en MC.

3.1.1.2 Citometría de flujo

Para el análisis por citometría de flujo, después de la incubación con anticuerpos; los espermatozoides fueron suspendidos en tampón PBS por simple agitación, siendo así luego absorbidos por el sistema de flujo del citómetro. Para el registro de datos, se consideró suficiente un muestreo de 1×10^4 eventos en total (10.000 espermatozoides – 100 %), representados por puntos a lo largo del área del cuadrante (*dot-plot*). Se dividió el cuadrante I en cuatro sub cuadrantes, llamados P1-Q1 (puntos rojos), P1-Q2 (puntos verdes), P1-Q3 (puntos azules) y P1-Q4 (puntos magenta). De estos cuatro sub cuadrantes, P1-Q1 y P1-Q2 se descartaron de las observaciones, ya que de acuerdo al parámetro de FSC, los eventos presentaron un mayor tamaño en comparación al espermatozoide normal (ver figura 27 B). Esto puede explicarse con las observaciones realizadas al microscopio de luz; en las cuales aparecieron grupos de espermatozoides aglutinados (imágenes no mostradas). Por otro lado, la subpoblación P1-Q4 de espermatozoides, reunió el mayor número de eventos tanto para MNC como para MC; los que no presentaron marca de fluorescencia.

Los análisis por citometría arrojaron como resultado, una clara tendencia a un aumento del número de células con marca en los residuos tirosina fosforilados (pTyr-PE)

en MC, inmediatamente desde el tiempo 2 h; lo cual tuvo un marcado aumento hasta el tiempo 6 h (ver figura 27 A). Entre los experimentos realizados, se observó en algunos casos, la disminución del porcentaje de espermatozoides marcados con pTyr-PE a las 6 h (datos no mostrados). Por lo que se consideró suficiente un margen prudente de trabajo hasta las 4 h de incubación para las evaluaciones del objetivo 3.

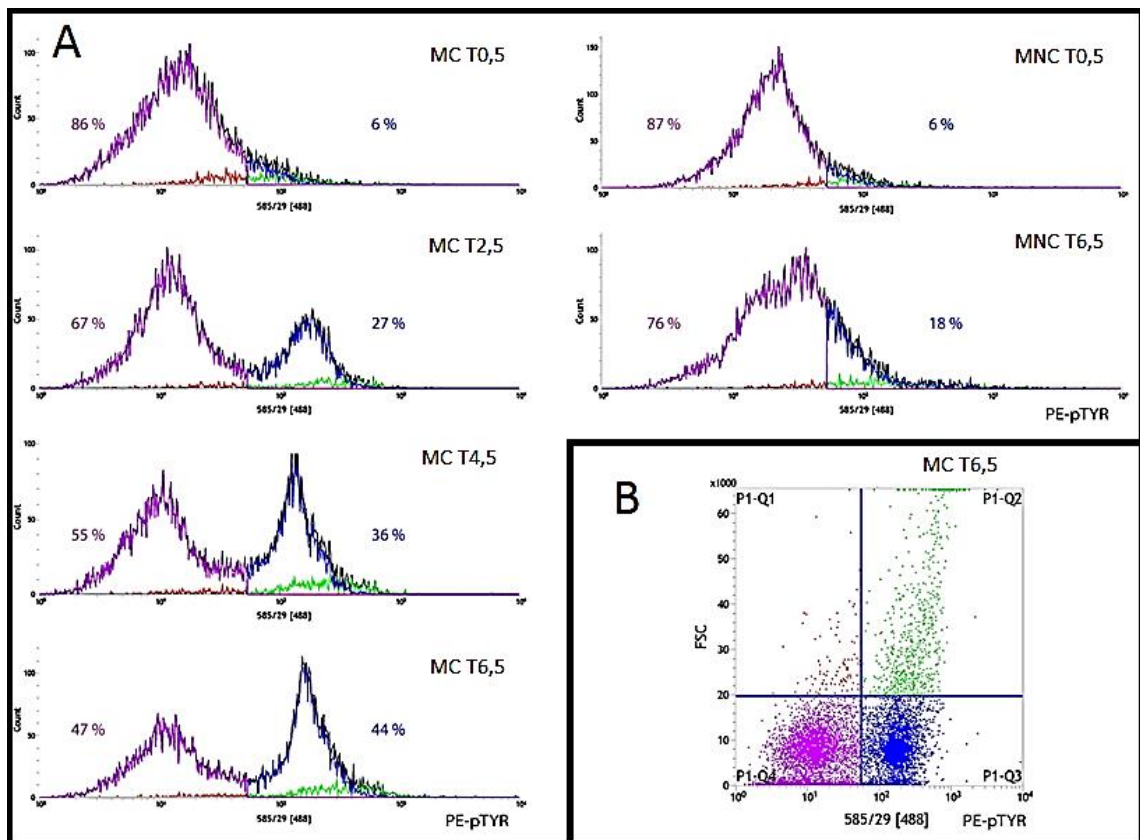


Figura 27. Histogramas del porcentaje de espermatozoides que presentan proteínas fosforiladas en sus residuos de tirosina, en MNC y MC.

(A) Histogramas de los tiempos de incubación de espermatozoides en MC y MNC, obtenidos por citometría de flujo. Se puede observar que a medida que transcurre el tiempo, el porcentaje de células capacitadas aumentó (aquí representados por las líneas azules). En MNC también hubo un aumento en el porcentaje de espermatozoides capacitados, pero no hubo un pico bien definido. **(B)** Dot-plot del tiempo 6 h de incubación en MC.

Cuando se compararon los resultados de la incubación en MC y MNC, se observó que para el tiempo 0 h, no hubo una mayor diferencia en el porcentaje de células con fluorescencia entre MC y MNC.

Luego, para el tiempo 2 h de incubación, apareció una segunda población con diferente intensidad de fluorescencia en MC, P1-Q3 (ver figura 28), un contraste notable con la lectura de MNC, lo que indica que las células son positivas para pTyr-PE. Esto en otras palabras, indicaría que aparentemente desde las 2 h de incubación en MC; el conjunto de puntos azules que alcanza un 27,31 %, correspondería a la población de espermatozoides capacitados (ver figura 28). Los ejes utilizados en cada *dot-plot* corresponden a los parámetros: *Forward scatter* (FSC en las ordenadas), el cual indica el tamaño de la célula detectada (medida en escala lineal de múltiplos de 1000; y el detector 585/29 (en las abscisas), que capta las ondas de emisión dentro del rango 585 nm \pm 29 nm (medidas en escala logarítmica).

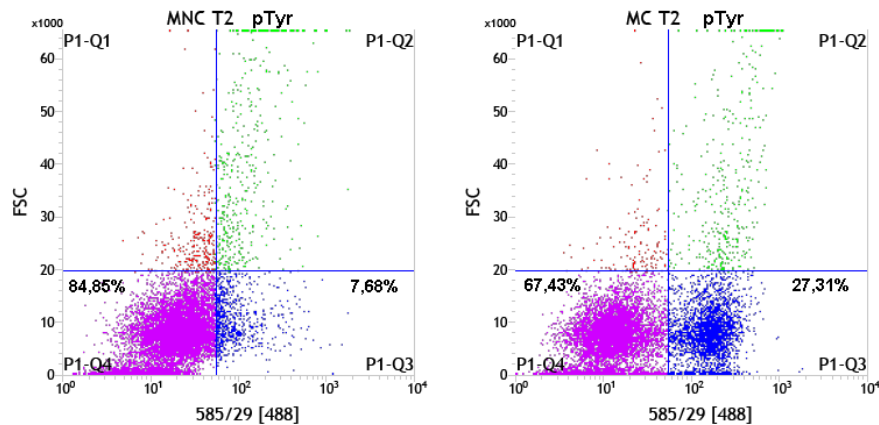
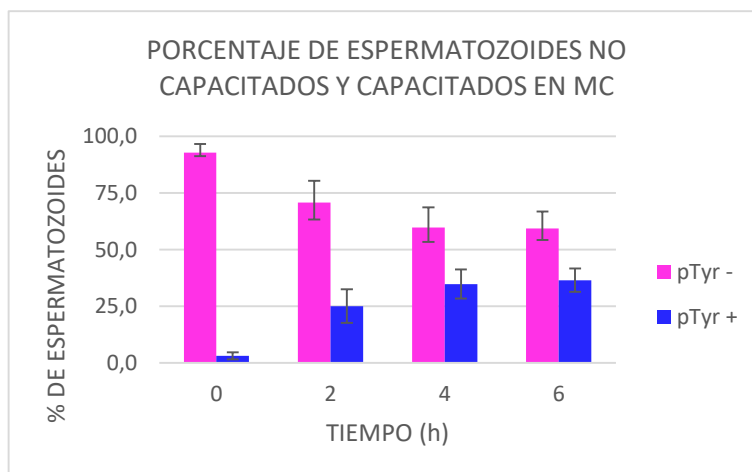
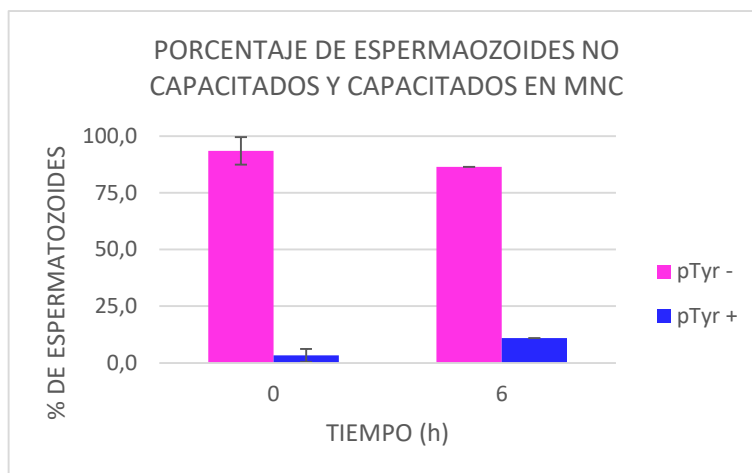


Figura 28. Dot-plots del porcentaje de espermatozoides que presentan proteínas fosforiladas en sus residuos de tirosina, en MNC y MC, a las 2h de incubación.

Se dispusieron cuatro cuadrantes para agrupar los espermatozoides; de acuerdo a diferencias entre intensidades de fluorescencia (abscisas). Aquí fue posible discernir la aparición de una población de células con mayor fluorescencia (puntos azules). Del total de la muestra analizada, donde sólo un 7,68 % presentó un mayor grado de fluorescencia para MNC; mientras que para MC se mostró un 27,31 % de espermatozoides con mayor fluorescencia.



HORA	MNC		MC	
	pTyr- %	pTyr+ %	pTyr- %	pTyr+ %
0	94	3	93	3
2	--	--	71	25*
4	--	--	60*	35*
6	87	11*	59*	37*

Figura 29. Porcentajes de espermatozoides pTyr- y pTyr+ después de su incubación en MNC y MC.

Gráficos de barras, obtenidos para espermatozoides incubados en MNC (A) y MC (B); a diferentes tiempos. Tabla de datos donde se representan los promedios de datos obtenidos en cuatro experimentos independientes. *Diferencias significativas con respecto al control. $p < 0,05$. N=3.

3.1.2 Objetivo 2: Caracterizar la actividad mitocondrial en diferentes tiempos de incubación en MNC y MC

Luego de haber determinado un tiempo de incubación adecuado para poder realizar las evaluaciones ya diseñadas; el siguiente punto fue la caracterización del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), como indicador de la actividad mitocondrial. La evaluación se realizó desde el tiempo 0,5 h; debido a que, según el protocolo para la determinación del $\Delta\psi_m$ con MTred es necesaria una pre incubación de 30 min (0,5 h) en el medio que se desee trabajar (MNC o MC). Fue así que caracterizamos el comportamiento de los espermatozoides incubados en MNC y MC, desde las 0,5 hasta las 6,5 h.

Para la incubación de las células, se procedió a diluir un volumen del *stock* (calculado para cada *stock* de espermatozoides) en un volumen de MC o MNC; para obtener una concentración final de 1×10^6 espermatozoides/mL, en placas de cultivo celular de 12 pocillos. Luego, se adicionaron 6 $\mu\text{L/mL}$ de MTred en cada pocillo, para evaluar el $\Delta\psi_m$ del espermatozoide por citometría de flujo, tanto en MC como en MNC. El resultado obtenido fue representado como un conjunto de puntos negros en el plano (*dot-plot*), y cada punto se consideró como un evento. Para cada N, se realizó un muestreo de 10.000 eventos en total; de los cuales se seleccionaron los que, en cuanto a tamaño y complejidad, cumplían con características similares, a la que se denomina población parental: P1. Fue así entonces, como se re ordenaron los datos; tomando a dicha selección P1 como el 100 % de espermatozoides (ver figura 30), que se analizarán con la ayuda del software FACS de BD.

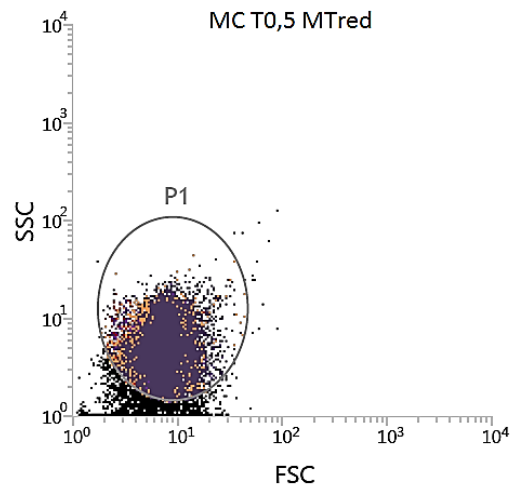


Figura 30. Población parental (P1) detectada al tiempo 0,5 h.

En las ordenadas se muestra el nivel de complejidad de las células “*Side Scatter*” (SSC), y en las abscisas su tamaño “*Forward Scatter*” (FSC). Ambos ejes se ajustaron a la escala logarítmica. De un total de eventos detectados por citometría de flujo (puntos totales en el plano), se seleccionaron sólo aquellos que cumplían con características de complejidad y tamaño similares (puntos dentro de la elipse), a la que denominamos población parental P1.

A partir de las 4,5 h, las observaciones de las muestras en MC, exhibieron a los espermatozoides con un movimiento hiperactivado, característico de los espermatozoides capacitados; mientras que en MNC, el movimiento flagelar más bien fue activado. Adicionalmente, en MC hubo un mayor número de espermatozoides inmóviles a las 6,5 h de incubación; los cuales si corresponden a espermatozoides muertos, no presentarán marca para MTred.

Luego, se trabajó con la población P1, y se detectó la fluorescencia emitida por MTred; utilizando un láser rojo para la excitación del fluoróforo ($\lambda = 640 \text{ nm}$). Para el eje de las abscisas, se muestran todas las señales de fluorescencia seleccionadas por un filtro 660/20BP (660/20 *band pass*), el cual deja pasar una banda cuyo pico de emisión es de 660 nm dentro de un rango de $\pm 20 \text{ nm}$ de longitud de onda. Dichos filtros, se eligieron de acuerdo al punto máximo de excitación y emisión de la marcación con MTred; los cuales son 622 nm para el máximo de excitación, y 648 nm para el máximo de emisión. Para el eje

de las ordenadas, se muestran todas las señales de fluorescencia seleccionadas por un filtro 750LP (750 long pass), el cual deja pasar a todas las señales mayores al valor señalado (750 nm), al mismo tiempo que bloquea a las que están por debajo de dicho valor. Utilizamos este último parámetro, debido a que MTred tiene un amplio rango de emisión de fluorescencia hacia el rojo lejano; y por lo tanto, permitía construir un *density plot* diferenciando 4 subpoblaciones de espermatozoides con distintas intensidades de fluorescencia. Esta modalidad de análisis arrojó un patrón característico en la distribución de eventos dentro del cuadrante I del plano (ver figura 29). Dicho patrón de distribución presentó acumulaciones de puntos (representaciones de los eventos contados por el citómetro de flujo), repartidos a lo largo del plano del cuadrante; los cuales se agrupan alrededor de 4 intensidades de fluorescencia distintas, en base a lo cual establecimos la presencia de 4 subpoblaciones de espermatozoides. Estas subpoblaciones se clasificaron como: Súper baja, baja, alta y súper alta fluorescencia o $\Delta\psi_m$. A cada subpoblación se le designó los siguientes nombres y colores distintivos: A1 (color rojo ladrillo), A2 (color violeta), A3 (color naranja) y A4 (color azul), ver figura 31 A. Cabe destacar que, esta selección se realizó con la opción “*global*” del software FACS de BD; la cual permite proyectar la clasificación original, desde el *density-plot* a cualquier otra modalidad de gráfico, representando estos datos por medio de otros parámetros, como FSC (ordenadas) v/s 660/20 nm [640] (abscisas), ver figura 31 B.

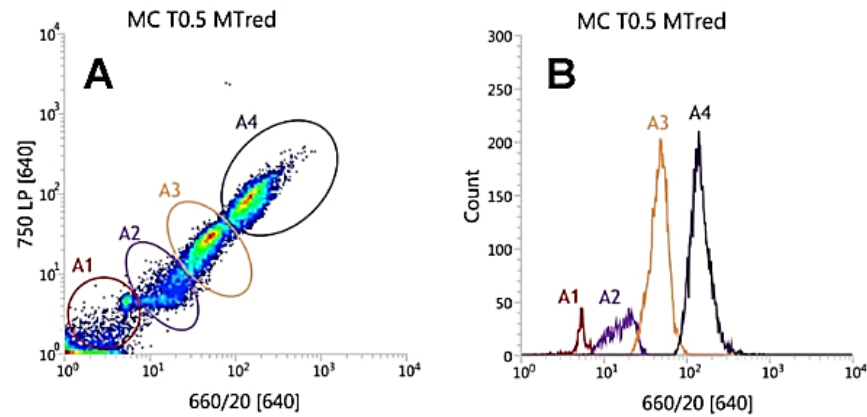


Figura 31. Eventos agrupados en subpoblaciones con diferente $\Delta\psi_m$ de la muestra de espermatozoides incubados con MTred en MC para el tiempo 0,5 h.

(A) *Density plot* de la muestra. La mayor densidad de eventos se representa en las zonas rojas de cada subpoblación, parámetro utilizado para discernir cuatro subpoblaciones. Detector 750 LP [640] (ordenadas), y 660/20 [640] (abscisas). Se utilizó un láser rojo, de 640 nm para la excitación. Ambos ejes están en escala logarítmica. **(B)** Histograma derivado del *density plot*, donde se representan claramente las 4 subpoblaciones: A1, A2, A3 y A4. Número de eventos (ordenadas) e intensidad de fluorescencia detectada a 660/20 [640] (abscisas).

Se analizaron las variaciones que ocurrían a nivel de $\Delta\psi_m$ desde las 0,5 h, hasta las 6 h de incubación, tanto en MC como en MNC. Observamos inmediatamente una diferencia entre los dos medios (MC y MNC); ya que, en MC, aumenta considerablemente el número de eventos en la subpoblación A3 (ver figura 32). La subpoblación A3 alcanzó un $33,2 \pm 3,2$ % en MC, mientras que en MNC tuvo sólo un $9,1 \pm 1,7$ % de eventos.

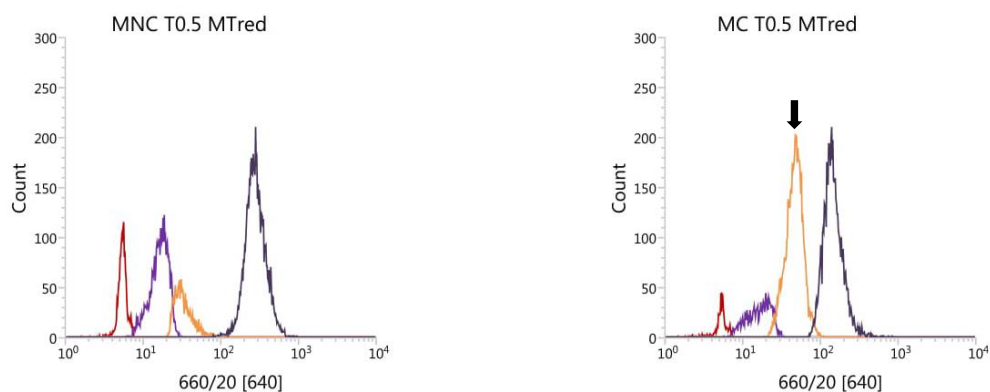


Figura 32. El MC aumenta el número de espermatozoides en la subpoblación A3 (histograma amarillo).

Los histogramas representan el número de espermatozoides (eventos) registrados para cada subpoblación alrededor de una intensidad de fluorescencia específica para MTred (detector 660/20 [640]).

Para cada punto de evaluación, se obtuvieron los porcentajes para cada una de las subpoblaciones, con respecto a la población parental P1 (ver tabla 3).

MC T0.5 MTred

	Eventos	% Total	% Parental
■ Todos los eventos	20.000	100,00%	####
■ P1	15.120	75,60%	75,60%
■ A1	502	2,51%	3,32%
■ A2	1.662	8,31%	10,99%
■ A3	6.273	31,36%	41,49%
■ A4	6.330	31,65%	41,87%

Tabla 3. Porcentajes de todos los eventos representativos de las cuatro subpoblaciones, relativos a P1.

Porcentajes de A1 (rojo), A2 (violeta), A3 (naranja) y A4 (azul); con respecto al total de los eventos seleccionados P1 (gris), para el tiempo 0,5 h en MC. Según la tabla, se puede observar que tanto A3 como A4 representan aproximadamente el 83 % del total de los eventos seleccionados (P1), siendo este último el 75,6 % de todos los eventos (mostrados en negro).

En la figura 32, se muestra un panel de histogramas representativos de cada punto de evaluación, tanto en MNC como en MC para el tiempo 0,5 h. Se observan variaciones en la distribución porcentual de cada subpoblación en función del tiempo de incubación.

Estas variaciones porcentuales se observan claramente en los gráficos de la figura 34; en los que se representan los promedios \pm el error estándar de cada punto de evaluación de cuatro experimentos independientes. Durante el tiempo de incubación en MNC, el porcentaje de eventos en la subpoblación A1, incrementó significativamente desde la 0,5 h ($20,6 \pm 5,5$ %), hasta las 4,5 h ($34,9 \pm 5,1$ %). Las subpoblaciones A2 y A4 disminuyeron progresivamente desde las 0,5 h ($19,3 \pm 4,6$ % y $48,1 \pm 2,3$ %), hasta las 6,5 h ($8,8 \pm 4,8$ % y $41,1 \pm 2,0$ %). Mientras que la subpoblación A3 se mantuvo constante (ver figura 34 A).

Durante el tiempo de incubación en MC, el porcentaje de eventos en la subpoblación A1 incrementó progresivamente desde las 0,5 h ($7,4 \pm 3,1$ %), hasta las 6,5 h ($20,2 \pm 2,5$ %). La subpoblación A2 incrementó desde el tiempo 0,5 h ($10,3 \pm 1,9$ %), hasta el tiempo 2,5 h ($18,4 \pm 2,5$ %) de incubación, manteniéndose constante hasta las 6,5 h. La subpoblación A3 disminuyó progresivamente desde las 0,5 h ($33,2 \pm 3,2$ %), hasta las 6,5 h ($20,7 \pm 4,1$ %); mientras que la subpoblación A4 disminuyó desde el tiempo 0,5 h ($45,0 \pm 4,2$ %) hasta las 2,5 h ($30,6 \pm 5,1$ %) de incubación; manteniéndose constante hasta las 6,5 h ($27,7 \pm 5,1$ %), ver figura 34 B.

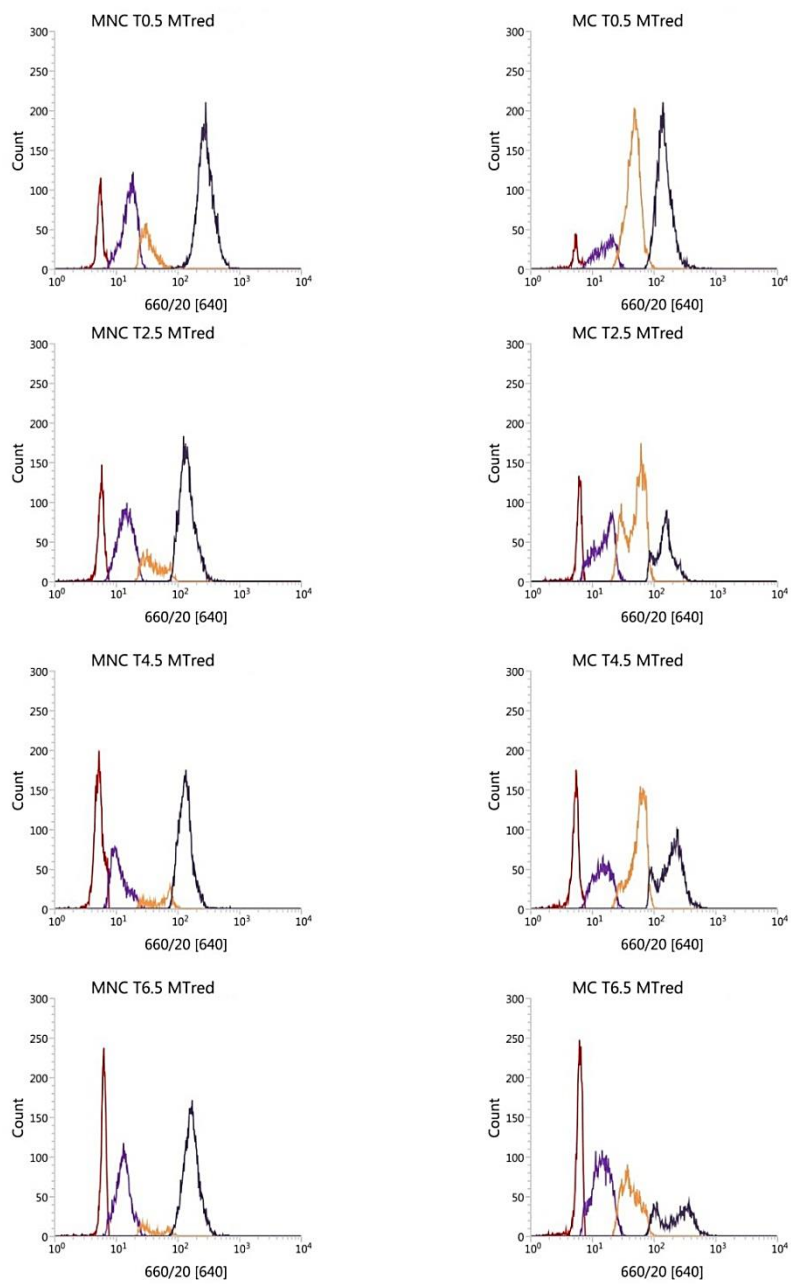
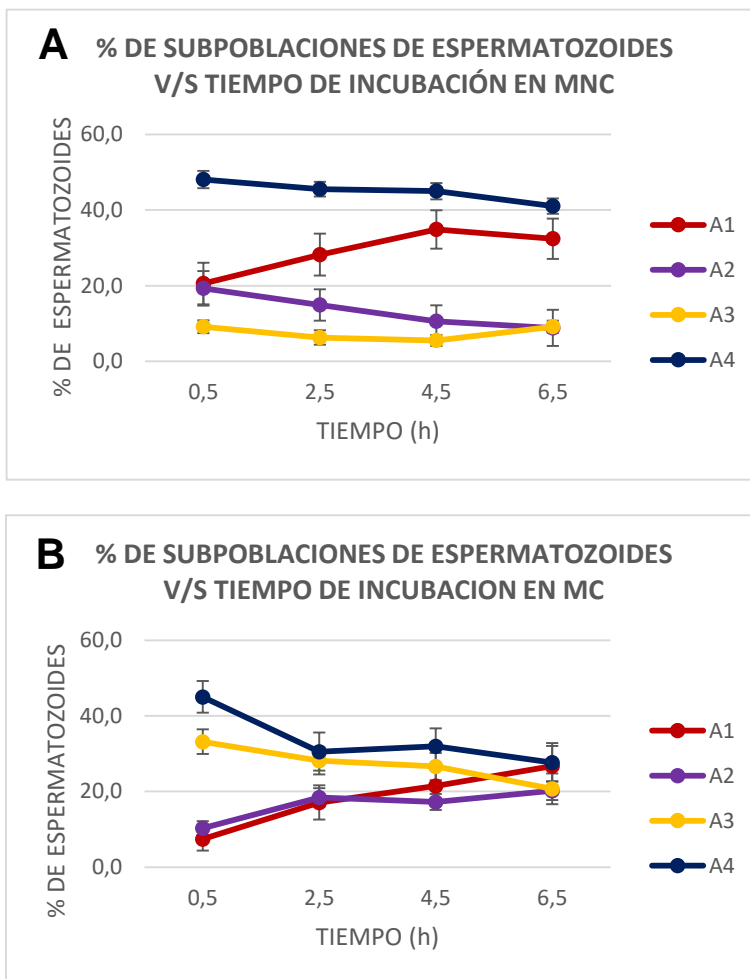


Figura 33. Histogramas del número de espermatozoides de cada subpoblación v/s intensidad de fluorescencia, a lo largo del tiempo de incubación (de 0,5 a 6,5 h), en MNC y MC.



HORA	MNC				MC			
	A1	A2	A3	A4	A1	A2	A3	A4
T 0,5	20,6	19,3	9,1	48,1	7,4	10,3	33,2	45,0
T 2,5	28,2	14,9	6,3	45,5	17,1	18,4	28,1	30,6*
T 4,5	34,9*	10,5	5,5	45,0	21,5*	17,2	26,6	32,0*
T 6,5	32,4*	8,8*	9,1	41,1	26,8*	20,2*	20,7*	27,7*

Figura 34. Distribución porcentual de las subpoblaciones con diferente $\Delta\psi_m$ durante la capacitación.

Gráficos de líneas, obtenidos para espermatozoides incubados en MNC (A) y MC (B); a diferentes tiempos. Tabla de datos donde se representan los promedios de datos obtenidos en cuatro experimentos independientes. *Diferencias significativas con respecto al control. $p < 0,05$. N=4.

Adicionalmente, se realizó una prueba con nigericina para evaluar los efectos de este agente desacoplante del $\Delta\psi_m$, a distintas concentraciones. Como primer punto, el $\Delta\psi_m$ no desapareció del todo en ambos medios, inclusive a la más alta concentración (67 μM). Esta concentración de nigericina produjo un shock osmótico en los espermatozoides (datos no mostrados), ya que se encontraban curvados alrededor de la pieza media. Sin embargo, los espermatozoides aún eran móviles en el tiempo de evaluación. El agente desacoplante del $\Delta\psi_m$ disminuye completamente el porcentaje de espermatozoides de las subpoblaciones A3 y A4 a la más alta dosis de nigericina (67 μM), ver figura 35. Esto sugiere que las subpoblaciones A1 y A2, no están registrando un $\Delta\psi_m$, sino más bien, una marcación inespecífica. Por lo tanto, las subpoblaciones A1 y A2 corresponderían a los espermatozoides con cero $\Delta\psi_m$ y nula actividad mitocondrial, un indicador de células muertas. Sin embargo, las células de las subpoblaciones A1 y A2 son capaces de responder a la estimulación de BSA y HCO_3^- , contenidos en el MC. Hecho que se contrapone a la consideración de que las subpoblaciones A1 y A2 sean células muertas, indicando que la marcación en estas subpoblaciones, es específica de un $\Delta\psi_m$. Validando, de este modo, la existencia de cuatro subpoblaciones con: Súper-baja, baja, alta y súper-alta actividad mitocondrial; las cuales también fueron detectadas por el grupo de (Ramio-Lluch et al., 2011), en espermatozoides de cerdo, utilizando JC-1 como marcador del $\Delta\psi_m$.

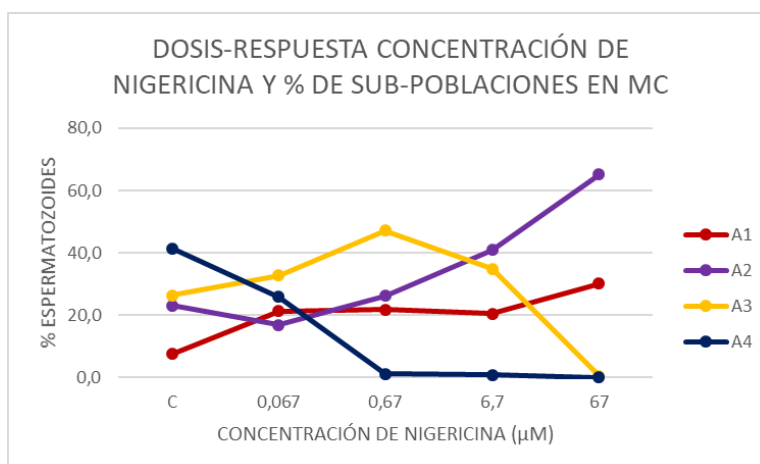
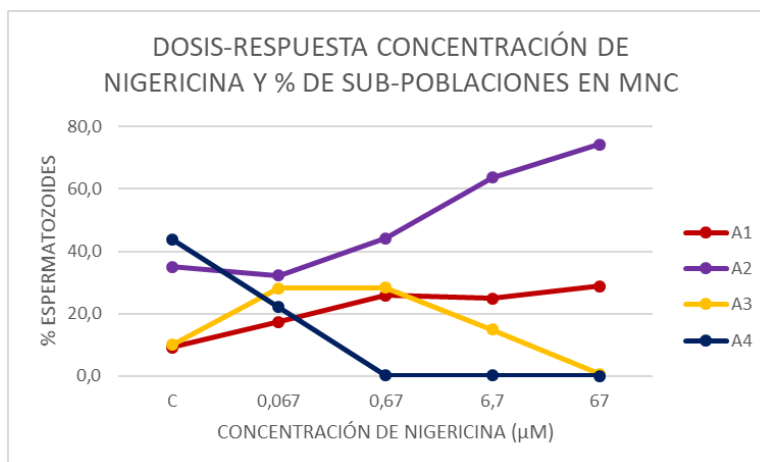


Figura 35. Distribución porcentual de las subpoblaciones de espermatozoides con diferente $\Delta\mu\text{m}$, expuestos a diferentes dosis de nigericina.

3.1.3 Objetivo 3: Establecer una relación entre la actividad mitocondrial y la capacitación del espermatozoide

Luego de haber caracterizado las variaciones de la actividad mitocondrial durante la capacitación de los espermatozoides, procedimos a caracterizar las subpoblaciones por inmunofluorescencia indirecta. Para ello, determinamos la presencia de proteínas fosforiladas en residuos de tirosina y en sustratos de PKA; esto con el fin de cuantificar el número de espermatozoides capacitados, distribuidos en las subpoblaciones A1, A2, A3 y A4.

Para caracterizar a cada subpoblación, utilizamos la opción de selección de células del citómetro (*sorting*), con la cual se aislaron los espermatozoides de cada subpoblación. Se eligió el tiempo 4,5 h como punto de evaluación, ya que, según los resultados anteriores, fue aquí donde se detectó un alto porcentaje de espermatozoides capacitados. Las cuatro subpoblaciones aisladas, se almacenaron en cuatro tubos recolectores correctamente rotulados, para su posterior tratamiento según el protocolo de inmunofluorescencia (ver pag 70).

Las subpoblaciones, extendidas sobre una impronta, fueron incubadas con el anticuerpo primario pTyr (clon 4G10), y luego incubadas con un secundario anti-IgG de ratón conjugado con Alexa flúor⁴⁸⁸. Las muestras fueron observadas al microscopio de fluorescencia, obteniendo imágenes de espermatozoides totales (campo claro), y de espermatozoides capacitados (campo oscuro). Estos últimos presentaron un característico color verde fluorescente (Alexa Fluor⁴⁸⁸), ver figura 36.

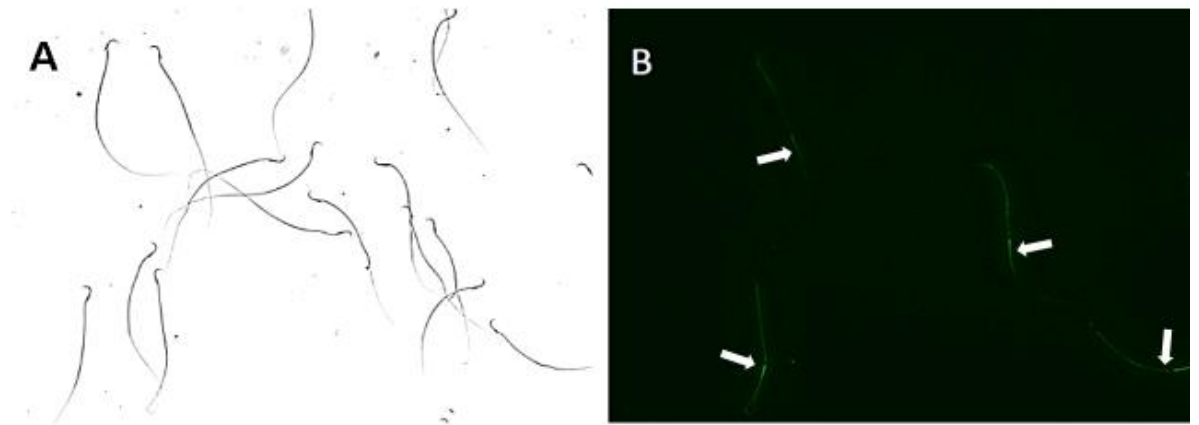


Figura 36. Microfotografías de espermatozoides marcados con anticuerpo anti-pTyr, obtenidas con el microscopio de fluorescencia.

(A) Campo claro y **(B)** campo oscuro. Las flechas indican a los espermatozoides pTyr+. El contraste y brillo de la imagen fueron modificados con fines ilustrativos. Magnificación original 40X.

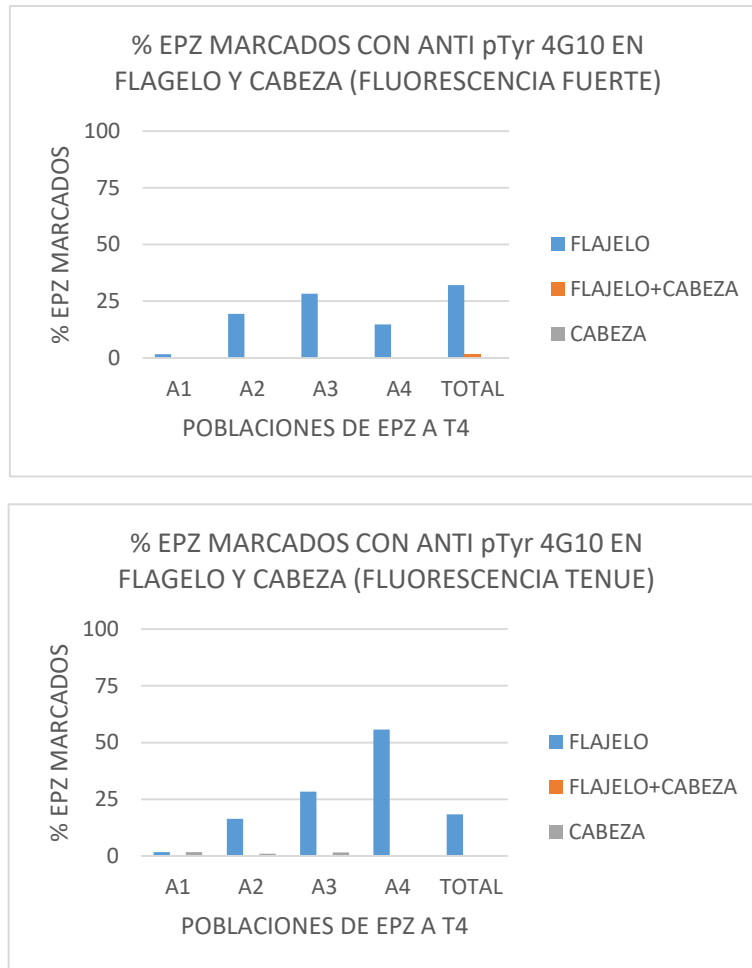


Figura 37. Porcentaje de espermatozoides pTyr+ presentes en cada subpoblación de espermatozoides, a las 4,5 h de incubación.

Para cada subpoblación se presentan los porcentajes de células marcadas con anticuerpo anti residuos de tirosina fosforilados (anti-pTyr). El nivel de fluorescencia fuerte o tenue fue un parámetro cualitativo.

Fue así como por medio del inmunoensayo indirecto, pudimos comprobar que efectivamente en las muestras de espermatozoides en MC al tiempo 4,5 h, hay una subpoblación de células capacitadas según el criterio de residuos de tirosina fosforilados (pSPKA). En la figura 37, se representa el porcentaje de espermatozoides pSPKA+ presentes en cada subpoblación.

Las subpoblaciones, extendidas sobre una impronta, fueron incubadas con el anticuerpo primario anti sustratos de PKA fosforilados (pSPKA), y luego incubadas con un anticuerpo secundario anti IgG de ratón conjugado con Alexa flúor⁴⁸⁸. Las muestras fueron observadas al microscopio de fluorescencia, obteniendo imágenes de espermatozoides totales (campo claro), y de espermatozoides capacitados (campo oscuro). Estos últimos presentaron una marca blanca en el campo oscuro (Alexa Fluor⁴⁸⁸), ver figura 38.

En la figura 39 se representa el porcentaje de espermatozoides pSPKA+, presentes en cada subpoblación. Se observó un enriquecimiento superior al 75 % de espermatozoides marcados en la subpoblación A3 y A4 para la marcación fuerte; mientras que se observó un enriquecimiento cercano al 90 % y 65 % de espermatozoides marcados con una fluorescencia tenue para las subpoblaciones A1 y A2, respectivamente. Para posteriores interpretaciones, sólo consideraremos la fluorescencia fuerte para la marca pSPKA+. Lo anterior es debido a que la fluorescencia tenue del marcador, puede ser señal de disminución de la vitalidad del espermatozoide. De hecho, los espermatozoides con fluorescencia tenue, están enriquecidas en las subpoblaciones con bajo $\Delta\psi_m$: A1 (90 %) y A2 (63 %).

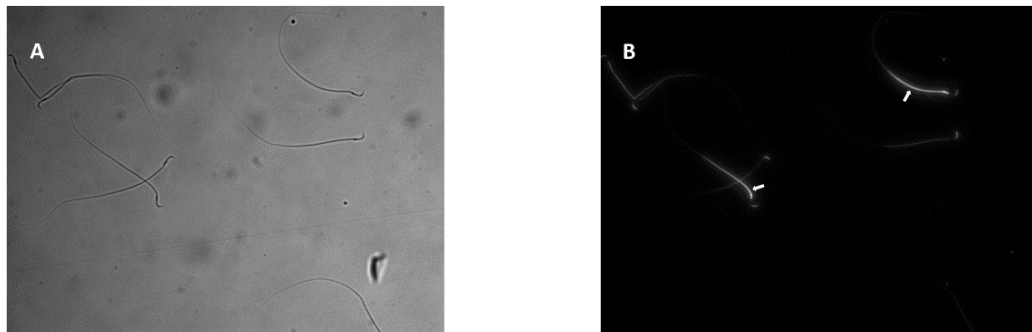


Figura 38. Microfotografías de espermatozoides marcados con anticuerpo anti-pSPKA, obtenidas con el microscopio de fluorescencia. (A) Campo claro y (B) campo oscuro. Las flechas indican a los espermatozoides pSPKA+ de fluorescencia fuerte. Magnificación original 40X.

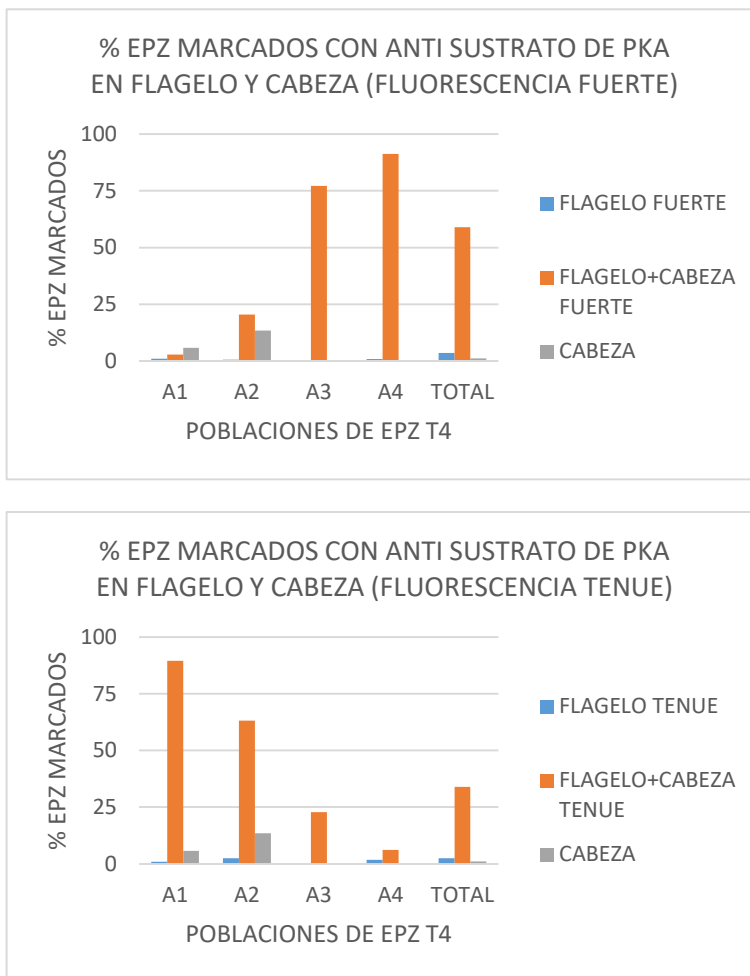


Figura 39. Porcentajes de espermatozoides pSPKA+, presentes en cada subpoblación a las 4,5 h de incubación.

Se presentan los porcentajes de células marcadas con PKA para cada subpoblación. Los espermatozoides están marcados con anticuerpo anti sustratos de PKA. El nivel de fluorescencia fuerte o tenue fue un parámetro cualitativo.

3.2 DISCUSIÓN

Los resultados de la presente tesis muestran que, para los espermatozoides de rata, 4 h de incubación en MC son suficientes para obtener un adecuado número de espermatozoides capacitados. Nuestros resultados también muestran que, existen 4 subpoblaciones de espermatozoides con diferente $\Delta\psi_m$ y que durante la capacitación ocurren cambios en la distribución porcentual de estas. La caracterización de las subpoblaciones, a las 4,5 h de incubación en MC; muestra un mayor porcentaje de espermatozoides cuyas proteínas están fosforiladas en residuos de tirosina (pTyr+) en la subpoblación A3, alcanzando un 28 %. Mientras que, muestra un enriquecimiento de espermatozoides cuyas proteínas están fosforiladas en sustratos de PKA (pSPKA+) en la subpoblación A3 y A4, alcanzando un 77 % y 91 %, respectivamente. Siendo evidente la disociación de estos dos marcadores de la capacitación cuando incorporamos una variable más al análisis, el $\Delta\psi_m$.

Uno de los hallazgos más interesantes respecto del $\Delta\psi_m$ durante la capacitación del espermatozoide, se muestra al inicio de la incubación en MC, donde ocurre un aumento significativo del porcentaje de espermatozoides con alto $\Delta\psi_m$ (subpoblación A3) con la consecuente disminución del porcentaje espermatozoides con super bajo y bajo $\Delta\psi_m$ (subpoblaciones A1 y A2). Este efecto debe ser producto de la albumina (BSA) y/o el ión bicarbonato (HCO_3^-) presentes exclusivamente en el MC. Proponemos que el incremento del $\Delta\psi_m$ es inducido por el HCO_3^- debido a que esta señal incrementa el pH citosólico (pHcito) y recientes estudios muestran que el pH de la matriz mitocondrial (pHmm) es directamente regulado por el pHcito.

El espermatozoide presenta varios transportadores de HCO_3^- localizados en la membrana de 3 regiones morfológicas: El acrosoma, el segmento ecuatorial y la pieza media del flagelo (Liu, Wang, & Chen, 2012). Estos transportadores permiten el ingreso de HCO_3^- al citosol y se ha establecido que el cotransportador NBC ($\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$) es necesario para el ingreso de HCO_3^- durante los eventos tempranos de la capacitación (Demarco et al., 2003). Nosotros trabajamos con espermatozoides obtenidos del epidídimo, los cuales son liberados en un medio que no contiene HCO_3^- sino HEPES a pH 7,2; y cuando son

incubados en MC, estos espermatozoides son expuestos por primera vez al HCO_3^- . Esta primera exposición de los espermatozoides epididimales al HCO_3^- nos sitúa a nivel de los eventos tempranos de la capacitación. El ingreso de HCO_3^- al citosol aumenta el pHcito, un evento necesario para la capacitación del espermatozoide (Parrish, Susko-Parrish, & First, 1989). El pHcito controla un amplio rango de procesos fisiológicos y provee un medio para integrar distintas funciones celulares con estados metabólicos (Busa & Nuccitelli, 1984). Sin embargo, y a pesar de su importancia, aún no se ha establecido la cascada de eventos que la alcalinización del pHcito regula en el espermatozoide durante la capacitación. La conexión entre el pHcito y el $\Delta\psi_m$ es materia de recientes investigaciones en otros tipos celulares. Así se ha reportado que ocurre hiperpolarización mitocondrial producto de la alcalinización del pHcito inducido por lactasistina, un inhibidor del proteasoma, en células epiteliales pigmentadas de la retina (Kim et al., 2003). En este estudio el $\Delta\psi_m$ fue cuantificado por agregación de JC-1, una molécula fluorescente que se retiene y se agrega en la matriz mitocondrial cuando ésta presenta $\Delta\psi_m$ y el pHcito fue medido por carboxietil-carboxifluoresceína, otra molécula fluorescente sensible al pH intracelular. Kim y cols muestran que el intercambiador aniónico $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ participa en la alcalinización del pHcito inducido por lactasistina, ya que su inhibición previene la alcalinización del pHcito así como también la hiperpolarización de la mitocondria. El efecto final de lactasistina es la inducción de apoptosis en las células epiteliales pigmentadas de la retina.

La hiperpolarización de la mitocondria se entiende como el incremento del $\Delta\psi_m$, un evento que nosotros observamos ante la presencia de HCO_3^- en el MC en las subpoblaciones con bajo $\Delta\psi_m$ (A1 y A2). El mecanismo por el cual la alcalinización del pHcito induce hiperpolarización de la mitocondria no ha sido descrito. Sin embargo y en una situación opuesta al estudio de Kim y col en 2003; el grupo de Poburko y cols muestra que la acidificación del pHcito acidifica rápidamente el pHmm (Poburko, Santo-Domingo, & Demaurex, 2011). En este estudio se caracterizaron las variaciones del pHcito y pHmm durante el incremento citosólico de Ca^{+2} , inducido por histamina en células HeLa. Los investigadores muestran que la histamina induce el incremento de Ca^{+2} , el cual posteriormente activa el cotransportador $\text{H}^+/\text{Ca}^{+2}$ (PMCA) por lo que ingresa H^+ y sale Ca^{+2} , acidificando de este modo el pHcito. La alta concentración de H^+ en el citosol activa el cotransportador K^+/H^+ y el transporte *import* fosfato (Pi) – H^+ en la membrana mitocondrial

interna; acidificando de este modo la matriz mitocondrial, hecho que disminuyó el gradiente de pH mitocondrial (ΔpH_m) y consecuentemente el $\Delta\psi_m$. El estudio de Pokurbo y cols. revela por primera vez una alta permeabilidad de la mitocondria frente a los protones, lo cual puede ser incompatible con la necesidad de la mitocondria de mantener un alto ΔpH_m a través de su membrana mitocondrial interna (Poburko et al., 2011). En este contexto, los autores sugieren que la cadena transportadora de electrones se localiza sólo en las crestas mitocondriales, restringiendo de este modo la alta ΔpH_m al espacio intermembrana de las crestas mitocondriales, dejando el resto del espacio intermembrana disponible para permitir la comunicación entre el pH_{cito} y el pH_{mm} . Siendo de este modo concebible, que los transportadores de H^+ como el cotransportador K^+/H^+ y el transportador *simport* $\text{Pi} - \text{H}^+$, cuyos sustratos requieren fácil acceso al citosol, puedan localizarse fuera de las crestas mitocondriales. A la luz de estos hallazgos, proponemos que, la alcalinización del pH_{cito} en el espermatozoide causado por el ingreso de HCO_3^- debe ser rápidamente equilibrado con el pH_{mm} , ocasionando una alcalinización de la matriz mitocondrial. Esta alcalinización producirá una disminución de la concentración de H^+ en la matriz mitocondrial, incrementando consecuentemente el $\Delta\psi_m$ de las subpoblaciones A1 y A2 para aumentar el porcentaje de células de la subpoblación A3 en los espermatozoides de rata.

La caracterización de la subpoblación A3, utilizando dos marcadores de la capacitación, después del *sorting*, muestra que esta subpoblación contiene el porcentaje más alto de espermatozoides pTyr^+ (28 %) comparado con las poblaciones A1 (2 %), A2 (19 %) y A4 (15 %), aunque la diferencia no es prominente. Mientras que contiene el segundo porcentaje más alto de espermatozoides pSPKA^+ (77 %) comparado con A1 (3 %) y A2 (20 %). Aunque ambos marcadores pTyr^+ y pSPKA^+ nos indican la presencia de espermatozoides capacitados en la subpoblación A3, la falta de concordancia entre estos marcadores sugiere que la subpoblación de espermatozoides presenta diferentes estadios de capacitación, siendo la marca pTyr^+ parte de los eventos tardíos de la capacitación; posterior a la activación de la PKA. Otra posible explicación a la falta de concordancia es la reciente identificación de la proteína tirosina quinasa responsable del incremento de la fosforilación en residuos tirosina de las proteínas durante la capacitación del espermatozoide, la FER quinasa (Alvau et al., 2016). Ratones deficientes de esta enzima

son fértiles, aunque sus espermatozoides son incapaces de presentar incrementos de la fosforilación en residuos de tirosina después de la incubación en MC *in vitro*. La disociación entre la marca pTyr+ y la capacidad fecundante del espermatozoide *in vivo* indica que este marcador le ocurre al espermatozoide incubado en MC *in vitro*, pero no le ocurre al espermatozoide fecundante *in vivo*. No existen reportes en los cuales se haya descrito que el espermatozoide que fecunda al ovocito presente altos niveles de proteínas fosforiladas en residuos de tirosina, este marcador se correlaciona muy bien con índices de fecundación *in vitro*, pero no existía evidencia causa efecto hasta el reciente reporte de Alvau y cols. Los espermatozoides deficientes de la quinasa FER no pierden la capacidad de incrementar las proteínas fosforiladas en sustratos de PKA, lo que indica que la marca pSPKA+ es un marcador que tiene mejor asociación con el potencial fecundante del espermatozoide, ya que la activación de la PKA es indispensable para la capacitación del espermatozoide (Gervasi & Visconti, 2016). Concluimos entonces que la subpoblación A3 esta enriquecida (77 %) con espermatozoides capacitados (pSPKA+), lo mismo que ocurre con la subpoblación A4, la cual esta enriquecida (91 %) con un mayor número de espermatozoides capacitados. Hecho que no ocurre con las subpoblaciones A1 (3 %) y A2 (20 %). Nuestros resultados muestran por primera vez evidencia de tipo causa efecto, respecto de la relación que existe entre espermatozoides con alto $\Delta\psi_m$ y su potencial capacidad fecundante. Discernir la función de espermatozoides con alto y super alto $\Delta\psi_m$ durante el proceso reproductivo e identificar *a priori*, usando este marcador, la subpoblación que contiene al espermatozoide fecundante será el objetivo de futuras investigaciones.

Finalmente, la falta de concordancia entre los dos marcadores de la capacitación pTyr y pSPKA y los recientes hallazgos del grupo de Alvau y cols, pone en evidencia que utilizar un marcador tan general como la fosforilación en residuos de tirosina o la fosforilación en sustratos de PKA no permiten dilucidar las cascadas finales de eventos necesarios y suficientes que caracterizan al espermatozoide fecundante (Alvau et al., 2016). Debemos por lo tanto utilizar como marcadores de la capacitación, proteínas diana específicas, cuya fosforilación es necesaria y/o suficiente para monitorear espermatozoides capacitados.

CAPÍTULO 4: CONCLUSIONES

4.1 RESUMEN DE RESULTADOS

1. Para los espermatozoides de rata, 4 h de incubación en MC son suficientes para obtener un adecuado número de espermatozoides capacitados.
2. Los espermatozoides de rata presentan 4 subpoblaciones de espermatozoides con diferente $\Delta\psi_m$. Estas subpoblaciones presentan super bajo, bajo, alto y super alto $\Delta\psi_m$ y nosotros los denominamos A1, A2, A3 y A4 respectivamente.
3. Durante la capacitación de los espermatozoides de rata, ocurren cambios en la distribución porcentual de las subpoblaciones A1, A2, A3 y A4.
4. Al inicio de la incubación en MC (0,5 h), ocurre un aumento significativo del porcentaje de espermatozoides con alto $\Delta\psi_m$ (subpoblación A3) y la consecuente disminución del porcentaje de espermatozoides con super bajo y bajo $\Delta\psi_m$ (subpoblaciones A1 y A2, respectivamente).
5. La caracterización de estas subpoblaciones a las 4,5 h de incubación en MC muestra un enriquecimiento de espermatozoides cuyas proteínas están fosforiladas en sustratos de PKA (pSPKA+), en la subpoblación A3 y A4, alcanzando un 77% y 91%, respectivamente. Hecho que no ocurre en las subpoblaciones A1 y A2, las cuales presentan sólo un 4% y 20% de espermatozoides pSPKA+, respectivamente.

Con los resultados obtenidos y mencionados anteriormente podemos concluir que las subpoblaciones con alto $\Delta\psi_m$ están enriquecidas con espermatozoides capacitados a las 4,5 h de incubación en MC. Nuestros resultados muestran por primera vez evidencia de tipo causa efecto, respecto de la relación que existe entre espermatozoides con alto $\Delta\psi_m$ y su potencial capacidad fecundante.

5 APÉNDICES

5.1 SOLUCIONES

5.1.1 Soluciones para el aislamiento y cuantificación de proteínas

Tampón RIPA (10 mL)

Tris HCl pH 7.5 (1 M)* 0,2 mL**

NaCl (1,5 M) 0,91 mL

SDS (10 %) 0,1 mL

Deoxicolato de Na 0,05 g

Triton X-100 1 mL

EDTA (0,05 M) 0,4 mL

Mezcla de Inhibidores de proteasa 1 pastilla

*Los datos en paréntesis al lado de cada reactivo corresponden a las concentraciones de las soluciones *stock* preparadas previamente.

**El volumen tomado corresponde a la solución *stock*.

Estándar de proteínas (10 mL)

BSA 0,136 g

Disolver en agua miliQ hasta el volumen indicado.

5.1.2 Soluciones para la inmunofluorescencia

Tampón PBS 10X (1L)

NaCl 80 g

KCl 2 g

Na₂HPO₄*7H₂O 27,2 g

KH₂PO₄ 2,4 g

Disolver en agua miliQ hasta el volumen indicado.

Tampón PBS 1X (1L)

Tampón de PBS 10X 100 mL

Agua milliQ 900 mL

Tampón de lavado (1L)

Tampón de PBS 1X 1000 mL

0,2 % Triton X-100 2 mL

Tampón de incubación I (20 mL)

2 % BSA 0,4 g

Tampón de lavado I 20 mL

5.1.3 Soluciones para SDS-PAGE**Acrilamida 30 % (200 mL)**

Acrilamida 58,4 g

Bis-acrilamida 1,6 g

Disolver en agua milliQ hasta el volumen indicado y filtrar.

SDS 10 % p/v (10 mL)

SDS 1 g

Disolver en agua milliQ hasta el volumen indicado.

APS 10 % p/v (10 mL)

APS 1 g

Disolver en agua milliQ hasta el volumen indicado.

Tris HCl 0,5 M pH 6,8 (100 mL)

Tris 6,1 g

Disolver en agua milliQ hasta el volumen indicado, ajustar pH con HCl y filtrar.

Tris HCl 1,5 M pH 8,8 (500 mL)

Tris 90,9 g

Disolver en agua miliQ hasta el volumen indicado, ajustar pH con HCl y filtrar.

Tampón de carga 2X (10 mL)

Tris HCl pH 6,8 (0,5 M) 2,5 mL

Glicerol 2 mL

SDS 0,4 g

DTT 0,31 g

Azul de Bromofenol 0,0001 g

Disolver en agua milliQ hasta el volumen indicado.

5.1.4 Preparación de geles

Gel separador 12 % (20 mL)

Agua miliQ 6,6 mL

Acrilamida (30 %) 8 mL

Tris (1,5 M; pH 8,8) 5 mL

SDS (10 %) 0,2 mL

APS (10 %) 0,2 mL

TEMED 0,008 mL

Gel concentrador 5 % (8 mL)

Agua miliQ 5,5 mL

Acrilamida (30 %) 1,3 mL

Tris (0,5 M, pH 6,8) 1 mL

SDS (10 %) 0,08 mL

APS (10 %) 0,08 mL

TEMED 0,008 mL

5.1.5 Tampón de electroforesis y electrotransferencia

Tampón de electroforesis 10X (1L)

Tris 30,2 g

Glicina 144 g

SDS 10 g

Disolver en agua miliQ hasta el volumen indicado y NO ajustar el pH.

Tampón de electrotransferencia 10X (1 L) (membrana PVDF)

Tris 30,2 g

Glicina 144 g

Disolver en agua miliQ hasta el volumen indicado y NO ajustar el pH.

Tampón de electrotransferencia 1X (1 L) (membrana PVDF)

Tampón de transferencia 10X 100 mL

Metanol 200 mL

Disolver en agua miliQ hasta el volumen indicado y NO ajustar el pH.

5.1.6 Soluciones para *western blot*

Tampón PBS 1X (1 L)

Tampón de PBS 10X 100 mL

Disolver en agua miliQ hasta el volumen indicado y ajustar el pH a 7,2 si es necesario.

Tampón de lavado (1 L)

Tampón de PBS 10X 100 mL

Agua miliQ 900 mL

0,02 % v/v Tritón X-100 0,2 mL

Tampón de incubación I (10 mL)

2 % BSA 0,2 g

Tampón de lavado 10 mL

Tampón de incubación II o Tampón de bloqueo (10 mL)

5 % Leche descremada 0,5 g

Tampón de lavado 10 mL

Tampón denaturante (100 mL)

SDS (10 %) 20 mL

Tris HCl pH 6,8 (0,5 M) 12,5 mL

Agua miliQ 67,5 mL

Adicionar 80 μ L de β -mercaptoetanol por cada 10 ml de tampón denaturante, antes de su uso.

5.1.7 Soluciones para revelar los films expuestos a luminiscencia

Solución de revelado I (100 mL).

Revelador Kodak GBX 22 mL

Agua milliQ 78 mL

Solución de fijación I (100 mL).

Fijador Kodak GBX 22 mL

Agua milliQ 78 mL

5.2 PROCEDIMIENTOS

5.2.1 Análisis por citometría

A medida que una célula pasa a través de un rayo láser, la luz se dispersa en diferentes direcciones como se muestra en la figura X, midiendo en qué dirección y cuanta luz se dispersa podemos establecer diferentes parámetros celulares. Estas señales electromagnéticas son transformadas por un sistema electrónico en datos numéricos, los cuales son proyectados en la pantalla de un computador. Esta herramienta nos permite establecer tanto el tamaño como la complejidad interna de una célula. La información obtenida se muestra visualmente en un tipo de gráfico denominado gráfico de puntos, en inglés “*Dot-plot*”, en el que cada punto, o “evento”, representa una sola célula.

En el gráfico de puntos (desde ahora en adelante llamaremos *dot-plot*), mostrado en la figura 40, se pueden ver diferentes tipos de células sanguíneas: Neutrófilos, monocitos y linfocitos; las cuales pueden diferenciarse entre sí, por la forma en que las células dispersan la luz hacia adelante “*Forward Scatter*” (FSC), y hacia los lados “*Side Scatter*” (SSC).

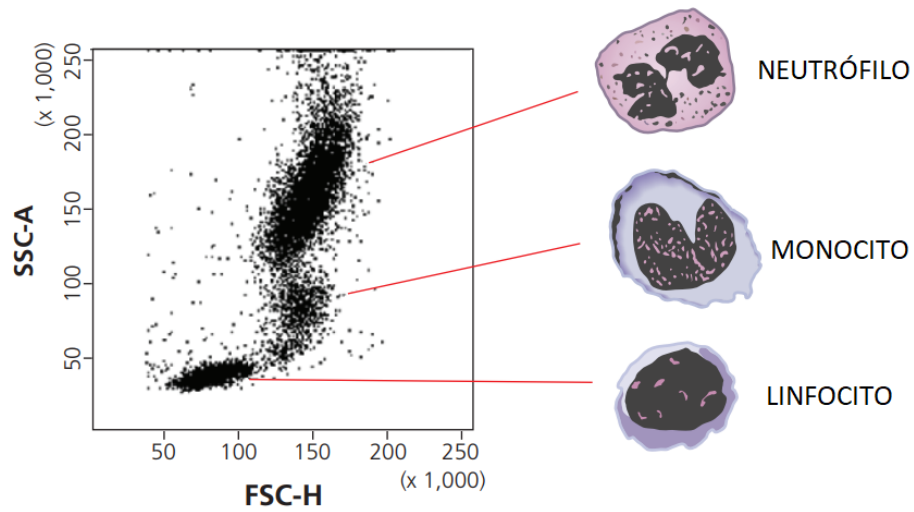


Figura 40. Dot-plot de muestra de sangre, en el que se muestran diferentes tipos de células sanguíneas.

En el eje de las ordenadas se encuentra el parámetro Side scatter (SSC), el cual mide la complejidad de las células, por ejemplo, los linfocitos poseen un solo núcleo prominente y muy poco citoplasma, situándose cerca del eje de las abscisas; mientras que los neutrófilos, quienes son polimorfonucleares y poseen un citoplasma granulado, se posicionan dentro del rango de los 100 a más de los 200 (X1000) unidades escalares. En el eje de las abscisas se encuentra el parámetro *Forward scatter* (FSC), el cual mide el tamaño de las células; por ejemplo, los neutrófilos y monocitos, en comparación con los linfocitos, son de mayor tamaño, por lo cual se sitúan en el mismo rango de los 100 a más de 150 (X1000) unidades escalares; mientras que los linfocitos apenas sobrepasan las 100 (X1000) unidades.

6 BIBLIOGRAFÍA

- Agnihotri, S. K., Agrawal, A. K., Hakim, B. A., Vishwakarma, A. L., Narender, T., Sachan, R., & Sachdev, M. (2016). Mitochondrial membrane potential (MMP) regulates sperm motility. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, *52*(9), 953-960. doi:10.1007/s11626-016-0061-x
- Alvau, A., Battistone, M. A., Gervasi, M. G., Navarrete, F. A., Xu, X., Sanchez-Cardenas, C., . . . Visconti, P. E. (2016). The tyrosine kinase FER is responsible for the capacitation-associated increase in tyrosine phosphorylation in murine sperm. *Development*, *143*(13), 2325-2333. doi:10.1242/dev.136499
- Amaral, A., Ramalho-Santos, J., & St John, J. C. (2007). The expression of polymerase gamma and mitochondrial transcription factor A and the regulation of mitochondrial DNA content in mature human sperm. *Human Reproduction*, *22*(6), 1585-1596. doi:10.1093/humrep/dem030
- Amieux, P. S., & McKnight, G. S. (2002). The essential role of RI alpha in the maintenance of regulated PKA activity. *Ann N Y Acad Sci*, *968*, 75-95.
- Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., Debruijn, M. H. L., Coulson, A. R., Drouin, J., . . . Young, I. G. (1981). Sequence and Organization of the Human Mitochondrial Genome. *Nature*, *290*(5806), 457-465. doi:DOI 10.1038/290457a0
- AnkelSimons, F., & Cummins, J. M. (1996). Misconceptions about mitochondria and mammalian fertilization: Implications for theories on human evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(24), 13859-13863. doi:DOI 10.1073/pnas.93.24.13859
- Audesirk Teresa, Audesirk Gerald and Byers Bruce E. (2003). *Biología: La vida en la tierra. Pearson Educación.*
- Baker, M. A., & Aitken, R. J. (2005). Reactive oxygen species in spermatozoa: methods for monitoring and significance for the origins of genetic disease and infertility. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *3*. doi:Artn 67
10.1186/1477-7827-3-67
- Baumgarten H. G., Holstein A. F. and Rosengren E. (1971). Arrangement, ultrastructure and adrenergic innervation of smooth musculature of ductuli efferentes, ductus epididymis and ductus deferens of man. *Z. Zellforsch.*, *120*, 37-79.
- Benoit, M. J. (1926). Recherches anatomiques, cytologiques et histophysiologiques sur les voies excrétoires du testicule, chez les mammifères. *Arch. Anat. Histol. Embryol.*, *5*, 173-412.
- Bereiterhahn, J., & Voth, M. (1994). Dynamics of Mitochondria in Living Cells - Shape Changes, Dislocations, Fusion, and Fission of Mitochondria. *Microscopy Research and Technique*, *27*(3), 198-219. doi:DOI 10.1002/jemt.1070270303
- Boatman, D. E., & Robbins, R. S. (1991). Bicarbonate: carbon-dioxide regulation of sperm capacitation, hyperactivated motility, and acrosome reactions. *Biology of Reproduction*, *44*(5), 806-813. doi:10.1095/biolreprod44.5.806
- Busa, W. B., & Nuccitelli, R. (1984). Metabolic regulation via intracellular pH. *Am J Physiol*, *246*(4 Pt 2), R409-438. doi:10.1152/ajpregu.1984.246.4.R409
- Clayton, D.A. (2000). Transcription and replication of mitochondrial DNA. *Human Reproduction*, *15*, 11-17.
- Cummins, J. (1998). Mitochondrial DNA in mammalian reproduction. *Reviews of Reproduction*, *3*(3), 172-182. doi:DOI 10.1530/revreprod/3.3.172

- Curtis Helena, Sue Barnes S., Schnek Adriana, Massarini Alicia. (2011). Biología. *Panamericana*, 7, 783.
- Chang, M.C. (1951). Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature*, 168, 697-698.
- David L. Nelson, Michael M. Cox. (2015). Lehninger. Principios de bioquímica. *OMEGA*, 6.
- David, Le Vay. (2011). Anatomía y fisiología humana. *Paidotribo*, 2, 331-332.
- Demarco, I. A., Espinosa, F., Edwards, J., Sosnik, J., De La Vega-Beltran, J. L., Hockensmith, J. W., . . . Visconti, P. E. (2003). Involvement of a Na⁺/HCO⁻³ cotransporter in mouse sperm capacitation. *J Biol Chem*, 278(9), 7001-7009. doi:10.1074/jbc.M206284200
- Eytan, G. D., Carlenor, E., & Rydstrom, J. (1990). Energy-Linked Transhydrogenase - Effects of Valinomycin and Nigericin on the Atp-Driven Transhydrogenase Reaction Catalyzed by Reconstituted Transhydrogenase-Atpase Vesicles. *Journal of Biological Chemistry*, 265(22), 12949-12954.
- Folgero, T., Bertheussen, K., Lindal, S., Torbergsen, T., & Oian, P. (1993). Mitochondrial Disease and Reduced Sperm Motility. *Human Reproduction*, 8(11), 1863-1868. doi:DOI 10.1093/oxfordjournals.humrep.a137950
- Gadella, B. M., & Harrison, R. A. (2000). The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development*, 127(11), 2407-2420.
- Gadella, B. M., Lopescardoza, M., Vangolde, L. M. G., Colenbrander, B., & Gadella, T. W. J. (1995). Glycolipid Migration from the Apical to the Equatorial Subdomains of the Sperm Head Plasma-Membrane Precedes the Acrosome Reaction - Evidence for a Primary Capacitation Event in Boar Spermatozoa. *Journal of Cell Science*, 108, 935-946.
- Gallon, F., Marchetti, C., Jouy, N., & Marchetti, P. (2006). The functionality of mitochondria differentiates human spermatozoa with high and low fertilizing capability. *Fertility and Sterility*, 86(5), 1526-1530. doi:10.1016/j.fertnstert.2006.03.055
- Ganzle, M. G., & Vogel, R. F. (2003). Studies on the mode of action of reutericyclin. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2), 1305-1307. doi:10.1128/Aem.69.2.1305-1307.2003
- Gervasi, M. G., & Visconti, P. E. (2016). Chang's meaning of capacitation: A molecular perspective. *Molecular Reproduction and Development*, 83(10), 860-874. doi:10.1002/mrd.22663
- Gottlieb, E., Vander Heiden, M. G., & Thompson, C. B. (2000). Bcl-x(L) prevents the initial decrease in mitochondrial membrane potential and subsequent reactive oxygen species production during tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 20(15), 5680-5689. doi:Doi 10.1128/Mcb.20.15.5680-5689.2000
- Gravance, C. G., Garner, D. L., Miller, M. G., & Berger, T. (2001). Fluorescent probes and flow cytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial function. *Reproductive Toxicology*, 15(1), 5-10.
- Guffanti, A. A., Davidson, L. F., Mann, T. M., & Krulwich, T. A. (1979). Nigericin-Induced Death of an Acidophilic Bacterium. *Journal of General Microbiology*, 114(Sep), 201-206. doi:Doi 10.1099/00221287-114-1-201
- Hecht, N. B., Liem, H., Kleene, K. C., Distel, R. J., & Ho, S. M. (1984). Maternal Inheritance of the Mouse Mitochondrial Genome Is Not Mediated by a Loss or Gross Alteration of the Paternal Mitochondrial-DNA or by Methylation of the Oocyte Mitochondrial-DNA. *Developmental Biology*, 102(2), 452-461. doi:Doi 10.1016/0012-1606(84)90210-0

- Ickowicz, D., Finkelstein, M., & Breitbart, H. (2012). Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. *Asian Journal of Andrology*, *14*(6), 816-821. doi:10.1038/aja.2012.81
- Ishijima, S. (2011). Dynamics of flagellar force generated by a hyperactivated spermatozoon. *Reproduction*, *142*(3), 409-415. doi:10.1530/Rep-10-0445
- Ishijima, S. (2016). Self-Sustained Oscillatory Sliding Movement of Doublet Microtubules and Flagellar Bend Formation. *Plos One*, *11*(2). doi:ARTN e0148880
10.1371/journal.pone.0148880
- Kasai, T., Ogawa, K., Mizuno, K., Nagai, S., Uchida, Y., Ohta, S., . . . Hoshi, K. (2002). Relationship between sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility, and fertility potential. *Asian Journal of Andrology*, *4*(2), 97-103.
- Kim, J. M., Bae, H. R., Park, B. S., Lee, J. M., Ahn, H. B., Rho, J. H., . . . Yoo, Y. H. (2003). Early mitochondrial hyperpolarization and intracellular alkalinization in lactacystin-induced apoptosis of retinal pigment epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther*, *305*(2), 474-481. doi:10.1124/jpet.102.047811
- Liu, Y., Wang, D. K., & Chen, L. M. (2012). The physiology of bicarbonate transporters in mammalian reproduction. *Biology of Reproduction*, *86*(4), 99. doi:10.1095/biolreprod.111.096826
- Love, C. C., Thompson, J. A., Brinsko, S. P., Rigby, S. L., Blanchard, T. L., Lowry, V. K., & Varner, D. D. (2003). Relationship between stallion sperm motility and viability as detected by two fluorescence staining techniques using flow cytometry. *Theriogenology*, *60*(6), 1127-1138. doi:10.1016/S0093-691x(03)00122-5
- M., Phillips D. (1972). Comparative analysis of mammalian sperm motility. *J. Cell. Biol.*, 561–573.
- Marchetti, C., Jouy, N., Leroy-Martin, B., Defosse, A., Formstecher, P., & Marchetti, P. (2004). Comparison of four fluorochromes for the detection of the inner mitochondrial membrane potential in human spermatozoa and their correlation with sperm motility. *Human Reproduction*, *19*(10), 2267-2276. doi:10.1093/humrep/deh416
- Marchetti, C., Obert, G., Defosse, A., Formstecher, P., & Marchetti, P. (2002). Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. *Human Reproduction*, *17*(5), 1257-1265. doi:DOI 10.1093/humrep/17.5.1257
- María José del Río, Ana Godoy, Alejandra Toro, Renán Orellana, Manuel E. Cortés, Ricardo D. Moreno y Pilar Vigil. (2007). La reacción acrosómica del espermatozoide: Avances recientes. *ResearchGate*, *4*. doi:10.1016/S1698-031X(07)74086-4
- Martinez-Pastor, F., Johannisson, A., Gil, J., Kaabi, M., Anel, L., Paz, P., & Rodriguez-Martinez, H. (2004). Use of chromatin stability assay, mitochondrial stain JC-1, and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen-thawed ram semen. *Animal Reproduction Science*, *84*(1-2), 121-133. doi:10.1016/j.anireprosci.2003.12.006
- Mukai, C., & Okuno, M. (2004). Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. *Biology of Reproduction*, *71*(2), 540-547. doi:10.1095/biolreprod.103.026054
- Mundy A. J., Ryder T. A., Endmonds D. K. (1995). Asthenozoospermia and the human sperm mid-piece. *Hum. Reprod.*, *10*:116-119.

- Nakada, K., Sato, A., & Hayashi, J. I. (2006). Mitochondria-related male infertility. *Neuromuscular Disorders*, 16, S58-S58.
- Neil A. Campbell, Jane B. Reece. (2007). Biología. *Panamericana*, 7, 971.
- Neill, Knobil &. (2006). Physiology of reproduction. *Elseiver*.
- Oliver H. Lowry, Nira J. Rosebrough, A. Lewis Farr and Rose J. Randall. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- Parrish, J. J., Susko-Parrish, J. L., & First, N. L. (1989). Capacitation of bovine sperm by heparin: inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. *Biology of Reproduction*, 41(4), 683-699. doi:10.1095/biolreprod41.4.683
- Poburko, D., Santo-Domingo, J., & Demaux, N. (2011). Dynamic regulation of the mitochondrial proton gradient during cytosolic calcium elevations. *J Biol Chem*, 286(13), 11672-11684. doi:10.1074/jbc.M110.159962
- Ramalho-Santos, J., Varum, S., Amaral, S., Mota, P. C., Sousa, A. P., & Amaral, A. (2009). Mitochondrial functionality in reproduction: from gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells. *Human Reproduction Update*, 15(5), 553-572. doi:10.1093/humupd/dmp016
- Ramio-Lluch, L., Fernandez-Novell, J. M., Pena, A., Colas, C., Cebrian-Perez, J. A., Muino-Blanco, T., . . . Rodriguez-Gil, J. E. (2011). 'In Vitro' Capacitation and Acrosome Reaction are Concomitant with Specific Changes in Mitochondrial Activity in Boar Sperm: Evidence for a Nucleated Mitochondrial Activation and for the Existence of a Capacitation-Sensitive Subpopulational Structure. *Reproduction in Domestic Animals*, 46(4), 664-673. doi:10.1111/j.1439-0531.2010.01725.x
- Rochwerger, L., & Cuasnicu, P. S. (1992). Redistribution of a rat sperm epididymal glycoprotein after in vitro and in vivo capacitation. *Mol Reprod Dev*, 31(1), 34-41. doi:10.1002/mrd.1080310107
- Ruiz-Pesini, E., Diez, C., Lapena, A. C., Perez-Martos, A., Montoya, J., Alvarez, E., . . . Lopez-Perez, M. J. (1998). Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities. *Clinical Chemistry*, 44(8), 1616-1620.
- Ruiz-Pesini, E., Lapena, A. C., Diez, C., Alvarez, E., Enriquez, J. A., & Lopez-Perez, M. J. (2000). Seminal quality correlates with mitochondrial functionality. *Clinica Chimica Acta*, 300(1-2), 97-105. doi:Doi 10.1016/S0009-8981(00)00305-3
- Salicioni, A. M., Platt, M. D., Wertheimer, E. V., Arcelay, E., Allaire, A., Sosnik, J., & Visconti, P. E. (2007). Signalling pathways involved in sperm capacitation. *Soc Reprod Fertil Suppl*, 65, 245-259.
- Shivaji, S., Kota, V., & Siva, A. B. (2009). The role of mitochondrial proteins in sperm capacitation. *J Reprod Immunol*, 83(1-2), 14-18. doi:10.1016/j.jri.2009.08.009
- Slott, V. L., Suarez, J. D., & Perreault, S. D. (1991). Rat Sperm Motility Analysis - Methodologic Considerations. *Reproductive Toxicology*, 5(5), 449-458. doi:Doi 10.1016/0890-6238(91)90009-5
- Spinaci, M., De Ambrogi, M., Volpe, S., Galeati, G., Tamanini, C., & Seren, E. (2005). Effect of staining and sorting on boar sperm membrane integrity, mitochondrial activity and in vitro blastocyst development. *Theriogenology*, 64(1), 191-201. doi:10.1016/j.theriogenology.2004.11.010

- Spiropoulos, J., Turnbull, D. M., & Chinnery, P. F. (2002). Can mitochondrial DNA mutations cause sperm dysfunction? *Molecular Human Reproduction*, *8*(8), 719-721. doi:DOI 10.1093/molehr/8.8.719
- St John, J. C., Sakkas, D., & Barratt, C. L. R. (2000). A role for mitochondrial DNA and sperm survival. *Journal of Andrology*, *21*(2), 189-199.
- Suarez, S. S. (1996). Hyperactivated motility in sperm. *Journal of Andrology*, *17*(4), 331-335.
- Suarez, S. S., & Ho, H. C. (2003). Hyperactivated motility in sperm. *Reproduction in Domestic Animals*, *38*(2), 119-124. doi:DOI 10.1046/j.1439-0531.2003.00397.x
- Taanman, J. W. (1999). The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, *1410*(2), 103-123. doi:Doi 10.1016/S0005-2728(98)00161-3
- Topfer-Petersen, E., Friess, A. E., Stoffel, M., & Schill, W. B. (1990). Boar sperm membranes antigens. II. Reorganization of an integral membrane antigen during capacitation and acrosome reaction. *Histochemistry*, *93*(5), 491-495.
- Travis, A. J., & Kopf, G. S. (2002). The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. *J Clin Invest*, *110*(6), 731-736. doi:10.1172/JCI16392
- Troiano, L., Granata, A. R. M., Cossarizza, A., Kalashnikova, G., Bianchi, R., Pini, G., . . . Franceschi, C. (1998). Mitochondrial membrane potential and DNA stainability in human sperm cells: A flow cytometry analysis with implications for male infertility. *Experimental Cell Research*, *241*(2), 384-393. doi:DOI 10.1006/excr.1998.4064
- Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., & Onclin, K. (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, *57*(1), 149-179. doi:Doi 10.1016/S0093-691x(01)00664-1
- Visconti, P. E. (2009). Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(3), 667-668. doi:10.1073/pnas.0811895106
- Visconti, P. E., Bailey, J. L., Moore, G. D., Pan, D. Y., Oldsclarke, P., & Kopf, G. S. (1995). Capacitation of Mouse Spermatozoa .1. Correlation between the Capacitation State and Protein-Tyrosine Phosphorylation. *Development*, *121*(4), 1129-1137.
- Visconti, P. E., Galantino-Homer, H., Moore, G. D., Bailey, J. L., Ning, X., Fornes, M., & Kopf, G. S. (1998). The molecular basis of sperm capacitation. *J Androl*, *19*(2), 242-248.
- Visconti, P. E., Galantino-Homer, H., Ning, X., Moore, G. D., Valenzuela, J. P., Jorgez, C. J., . . . Kopf, G. S. (1999). Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm. beta-cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation. *J Biol Chem*, *274*(5), 3235-3242. doi:10.1074/jbc.274.5.3235
- Visconti, P. E., Krapf, D., de la Vega-Beltran, J. L., Acevedo, J. J., & Darszon, A. (2011). Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian Journal of Andrology*, *13*(3), 395-405. doi:10.1038/aja.2010.69
- Wennemuth, G., Carlson, A. E., Harper, A. J., & Babcock, D. F. (2003). Bicarbonate actions on flagellar and Ca²⁺ -channel responses: initial events in sperm activation. *Development*, *130*(7), 1317-1326.
- Wing, T. Y., & Christensen, A. K. (1982). Morphometric Studies on Rat Seminiferous Tubules. *American Journal of Anatomy*, *165*(1), 13-25. doi:DOI 10.1002/aja.1001650103

- Yanagimachi, R. (1981). Fertilization and Embryonic Development in vitro. *Plenum press*, 81-182.
- Yanagimachi, R. (1994). Mammalian fertilization in the physiology of reproduction. *E. Knobil & J. D. Neill. New York: Raven Press*, 189-317.